

Aus dem Medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde, Klinik für Neurologie
Direktor: Prof. Dr. med. W. H. Oertel

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem
Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg

Das immunsuppressive Potential von Dopaminrezeptoragonisten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Felix Kaspar Gronen

aus Marburg

Marburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 09.02.2006

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. N. Sommer

Koreferent: Prof. Dr. D. Gemsa

Abkürzungen

Ak	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zelle
BCT	Bromocriptin
CD	engl.: Cluster of differentiation, z.B. CD4
CFA	engl.: Complete Freund's adjuvant
CysA	Cyclosporin A
DA	Dopaminrezeptoragonist
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ELISA	engl.: Enzyme linked immunosorbent assay
GVHR	engl.: Graft versus host reaction
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen - äquivalent zu MHC
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
IPS	idiopathisches Parkinson Syndrom
MAG	Myelinassoziertes Glycoprotein
MBP	Basisches Myelinprotein Protein, engl.: myelin basic protein
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex - engl.: major histocompatibility complex
MOG	Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
PGL	Pergolid
PLP	Proteolipid Protein
PP-MS	Primär-progrediente Multiple Sklerose
PPX	Pramipexol
RA	Rheumatoide Arthritis
RR-MS	relapsierend-remittierende MS
Rt-PCR	engl.: reverse transcription-polymerase chain reaction
SLE	systemischer Lupus Erythematoses
SP-MS	Sekundärprogrediente Multiple Sklerose
TH	T-Helfer
THZ	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	
1.1 Multiple Sklerose	4
1.2 Therapie der Multiplen Sklerose	9
1.3 Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis als Modell der MS	10
1.4.1 Dopaminagonisten	14
1.4.2 Pharmakologie von Bromocriptin, Pergolid und Pramipexol	15
1.4.3 Dopaminagonisten, Prolaktin und Multiple Sklerose	17
1.4.4 Dopaminagonisten in der EAE als Fragestellung	19
2 Methoden	
2.1 Reagenzien	20
2.2 Tiere	21
2.3 Induktion und Verlaufsbeurteilung der EAE	21
2.4 Histologie	23
2.5 Bromocriptin, Pergolid und Pramipexol	23
2.6 Zellkulturexperimente	24
2.6.1 Zytokine und Proliferation der polyklonalen Lymphknotenzellen	24
2.6.2 Zytokine und Proliferation der Klonzellen	24
2.6.3 Klondaten	25
2.7 Prolaktinbestimmung	26
2.8 Statistik	26
3 Ergebnisse	
3.1 Therapieexperimente in vivo	27
3.2 Therapieexperimente in vitro	32
3.3 Histologie	35
4 Diskussion	
4.1 Prolaktin und Autoimmunkrankheiten	37
4.2 EAE und Dopaminagonisten	46
4.3 Dopaminagonisten und Multiple Sklerose	50
5 Zusammenfassung	52
Literatur	53

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste entzündlich-degenerative Entmarkungs-krankheit in Nordeuropa und Nordamerika. Sie hat eine Prävalenz von 60-100 pro 100000 Einwohner. Die meisten Patienten (etwa 80%) leiden zu Beginn an einer schubförmigen MS (RR-MS) mit vollständiger oder teilweiser Rückbildung neurologischer Defizite. Diese Form betrifft in zwei Drittel der Fälle Frauen und beginnt bevorzugt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Schubrate und Krankheitsverlauf der RR-MS sind sehr variabel, verhalten sich jedoch intraindividuell in den ersten Jahren oft stabil. Bei bis zu 70% der Patienten geht die Erkrankung in eine sekundär-progrediente Phase ohne vollständige Rückbildung der Symptome über, wobei zusätzlich Schübe überlagert sein können. Etwa 20% der Patienten leiden an einer primär-progredienten MS (PP-MS), welche ohne Schübe verläuft, meist im höheren Lebensalter auftritt und bei Frauen und Männern gleich häufig ist (Noseworthy et al., 2000).

Die Diagnose der multiplen Sklerose stützt sich vor allem auf die Klinik und in zweiter Linie auf Zusatzdiagnostik wie Magnetresonanztomographie (MRT), elektrophysiologische Methoden und Liquoruntersuchung. Sowohl den Poser- als auch den McDonald-Kriterien entsprechend müssen verschiedene Läsionen, bzw. deren klinisches oder labordiagnostisches Korrelat im ZNS nachzuweisen sein, die sich räumlich und zeitlich voneinander abgrenzen lassen. Die Poser-Kriterien von 1983 erlauben eine überwiegend klinische Diagnostik der MS. Mit der MRT können seit einigen Jahren Läsionen direkt in vivo entsprechend ihrer Aktivität dargestellt werden (Katz & Taubenberger et al., 1993). Im Zuge dieser Weiterentwicklung hat die Kernspintomographie einen größeren Stellenwert in der Diagnostik der MS erhalten, und sind heute wichtiger Bestandteil der McDonald-Kriterien (McDonald et al., 2001; Poser et al., 1983).

Kernspintomographische Kriterien lassen eine gewisse Aussage über den zu erwartenden Krankheitsverlauf zu. So korreliert die Läsionslast in der MRT mit dem Grad der Behinderung nach 3-jährigem Krankheitsverlauf (McFarland, 2002; Morgen et al., 2001). Merkmale, die für einen eher günstigen Verlauf der Erkrankung sprechen, sind früher Beginn, weibliches Geschlecht, und gute Rückbildungstendenz der Schübe (Martin et al., 1996). Klinisch kann sich je nach Lokalisation der Demyelinisierung die MS mit Paresen, Sensibilitätsstörungen, Sehstörungen, Koordinationsstörungen und

Blasenstörungen manifestieren. Nicht selten sind auch neuropsychologische Defizite und depressive Syndrome (Noseworthy et al., 2000).

Histologisch ist die MS charakterisiert durch disseminierte Infiltrate von Lymphozyten und Makrophagen im ZNS. Es zeigen sich Demyelinisierung, frühzeitig degenerierte Axone, und im fortgeschrittenen Stadium chronische Plaques mit fibröser Astrogliose (Lassmann et al., 1994; Raine, 1994). Ursprünglich nahm man an, die Demyelinisierung wäre hauptsächlich für bleibende neurologische Defizite bei der MS verantwortlich. Doch nicht nur entzündliche, sondern auch neurodegenerative Veränderungen charakterisieren die MS. So weiß man heutzutage, dass das Ausmaß der axonalen Schädigung im Wesentlichen zur klinisch-neurologischen Krankheitsausprägung beiträgt und damit korreliert (Filippi et al., 2003; Medana & Esiri, 2003; Trapp et al., 1998 u. 1999).

Die MS ist eine sehr heterogene Erkrankung. Dies zeigt sich bereits in unterschiedlichen Krankheitsverläufen (s.o.). In histologischen Untersuchungen konnte dies kürzlich ebenfalls dargestellt werden. Vier Muster wurden in den meisten Fällen unterschieden. Muster vom Typ 1 und 2 zeigten eine TZ-vermittelte, perivenös akzentuierte Destruktion mit konfluierenden Plaques. Bei erstgenanntem Muster scheinen Makrophagen bedeutend für die Pathogenese zu sein, beim zweiten zeigt sich eine Ansammlung von Immunglobulinen und Komplement. Typ 3 und 4 ähnelten einer primären Oligodendrozytendystrophie, bzw. zeigten eine eingeschränkte Oligodendrozytenfunktion mit Mangel an Remyelinisierung, welche ursächlich an der Demyelinisierung beteiligt sein kann (Lucchinetti et al., 2000). Eine große Heterogenität fiel auch in Untersuchungen zur Häufigkeit unterschiedlicher Zelltypen im Liquor von MS-Patienten auf. Cepok et al. konnten im Liquor zytologische Muster zeigen, bei denen das B-Zell/Monozytenverhältnis mit steigender Krankheitsintensität zunahm (Cepok et al., 2001). Zusammen mit dem hohen Maß an Variabilität des klinischen Phänotyps liegt es nahe zu spekulieren, ob unterschiedliche pathogenetische Pfade oder sogar Ätiologien diesen histologisch definierten Typen zugrunde liegen (Hemmer et al., 2003).

Die Ätiologie der MS ist bis heute ungeklärt. Vieles deutet daraufhin, dass es sich um eine Autoimmunerkrankung handelt. Hierfür sprechen a) die entzündlich demyelinisierenden Veränderungen in der Histopathologie, b) die Beeinflussbarkeit des Erkan-

kungsverlaufes durch immunmodulierende Therapien und c) die Reproduzierbarkeit von Erkrankungsmerkmalen im Tiermodell der experimentell autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) (Bjartmar & Trapp, 2001; Markovic-Plese & McFarland, 2001; Martin et al., 1992b).

Die Analyse der Immunantwort bei MS-Patienten gestaltet sich schwierig, da das oder die auslösenden Antigene nicht bekannt sind. Einige Befunde deuten auf eine Beteiligung von myelinspezifischen Antigenen hin. Bei MS-Patienten findet man im Serum, Liquor und ZNS Antikörper (Ak) gegen Myelinbestandteile (Archelos et al., 2000; Cross et al., 2001) und Myelinantigen-spezifische CD4⁺ TZ im Blut (Martin et al., 1992b). Diese T-Zellen können eine Vielzahl verschiedener Eigen- und Fremdantigene, darunter einige mikrobiellen Ursprungs, erkennen (Hemmer et al., 1997). Dies bietet eine mögliche Erklärung, wie es durch mikrobielle T-Zell-Aktivierung zu einer Kreuzreaktion mit Myelin kommen kann (Molekulare Mimikry)(Andersen et al., 1993). In einem weiteren Schritt könnte es durch Freisetzung von Myelinbestandteilen zu einer Ausweitung (sogenanntes „epitope spreading“) des autoimmunen Prozesses kommen (Lehmann et al., 1993).

Eines der am besten untersuchten Kandidatenantigene ist das basische Myelinprotein (MBP), das 30% des Gesamtmyelinproteins ausmacht (Williams & Deber, 1993; Olsson et al., 1990). Olsson et al. zeigten eine Erhöhung an MBP-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut und Liquor von MS-Patienten gegenüber Kontrollen (Olsson, 1992). Weitere Studien zeigten allerdings, dass T-Zellen bei MS-Patienten und gesunden Kontrollen mit gleicher Epitopenspezifität aus dem peripheren Blut isoliert werden konnten (Burns et al., 1983; Martin et al., 1990), was darauf hindeutet, dass autoreaktive T-Zellen auch Teil des normalen T-Zell-Repertoires sind. Diese Untersuchungen verdeutlichen die Rolle der T-Zellen bei MS, weisen aber auch auf die Grenzen der konventionellen Analyse humaner T-Zellen hin.

Ein weiteres wichtiges Kandidatenantigen ist das Proteolipoprotein (PLP). Es ist das häufigste Myelinprotein und macht 50% des Gesamtmyelinproteins aus. Zwei Peptide, 40-60 und 89-106, wurden von einer Vielzahl an T-Zell-Linien von MS-Patienten und Kontrollen erkannt. Diese T-Zellen trugen alle den CD4 Phänotyp, waren MHC II restringiert und besaßen zytotoxische Eigenschaften (Pelfrey et al., 1993; Pelfrey et al.,

1994). Weiterhin wurde von Immunantworten gegen Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) berichtet. Es handelt sich um ein Protein, das nur in sehr geringen Mengen (<1% des Myelins) im ZNS vorkommt, aufgrund seiner membranständigen Lokalisation aber eine große Rolle bei der B-Zell-vermittelten Immunantwort in der EAE spielen könnte (Iglesias et al., 2001).

Experimente im Tiermodell der MS, der EAE, deuteten auf eine ausschlaggebende Rolle myelinspezifischer T-Zellen vom CD4-Typ hin (Wekerle, 1994). Untersuchungen zur Pathogenese der MS waren in den letzten Jahren überwiegend auf CD4+ T-Zellen gerichtet. Zytotoxische T-Zellen vom CD8-Typ wurden weniger untersucht. Kürzlich haben Ergebnisse aus Tierversuchen (Steinman, 2001; Sun et al., 2001) und Beobachtungen beim Menschen Aufmerksamkeit für die CD8+ T-Zellen als Effektorzellen in der Pathogenese der MS geweckt (Hoftberger et al., 2004; Neumann et al., 2002). In Untersuchungen von MS-Läsionen konnten klonale Expansionen von CD8+ T-Zellen nachgewiesen werden (Babbe et al., 2000). Weitere Untersuchungen im ZNS, Liquor und Blut von MS-Patienten zeigten expandierte CD8+ T-Zell-Klone in allen drei Kompartimenten, welche über mehrere Jahre nachweisbar waren (Skulina et al., 2004). Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass CD8+ T-Zellen als zytotoxische Effektorzellen in pathologischen Immunreaktionen zur Schädigung des ZNS beitragen. Für die Präsentation möglicher Antigene für diese Zellen ist das Vorhandensein von MHC Klasse I Molekülen auf den Zielzellen erforderlich. Kürzlich konnte in einer großen histologischen Untersuchung die konstitutive Expression von MHC I auf Endothelzellen und Mikroglia und abhängig von der Stärke der Erkrankung fakultativ auch auf Neuronen und Axonen, Oligodendrozyten und Astrozyten eindrucksvoll bestätigt werden (Hoftberger et al., 2004). Mit diesen Ergebnissen ist die Hypothese vereinbar, dass klonal expandierte T-Zell-Klone in die Pathogenese der MS involviert sind.

Neben T-Zellen spielen auch B-Zellen eine Rolle bei der MS (Hohlfeld & Wekerle, 2001), beispielsweise kommt es im Liquor von MS-Patienten zu einer deutlichen Akkumulation von B-Zellklonen (Colombo et al., 2000). Die Daten deuten auf eine kompartimentbezogene klonale Expansion hin. Diagnostisch wird die hierbei entstehende intrathekale IgG Produktion, gemessen als Delpech-Lichtblau-Quotient oder Reiber-Quotient, oder dargestellt als oligoklonale Banden in der isoelektrischen Fokussierung, verwendet (Correale & de los Milagros Bassani Molinas, 2002).

Epidemiologische Studien legen nahe, dass Umweltfaktoren für die Entstehung der MS mitverantwortlich sind (Ebers & Sadovnick, 1994). Die Bedeutung nicht hereditärer Faktoren in der Entstehung der MS wird beispielsweise durch die vermutete Multiple-Sklerose-Epidemie auf den Farøer Inseln unterstützt (Kurtzke et al., 1995; Kurtzke, 2000a). Dort war die MS vor dem Zweiten Weltkrieg unbekannt. Nach Besetzung durch britische Truppen traten insgesamt vier "Epidemien" auf, in deren Folge bis 1990 50 Personen an MS erkrankten. In den ersten Epidemien deckten sich die Wohngebiete der erkrankten Patienten mit den Regionen, in denen britische Soldaten stationiert waren. Heute ist die Prävalenz auf den Farøer Inseln vergleichbar mit anderen nordeuropäischen Regionen.

Es bestehen regionale Unterschiede bezüglich der Prävalenz der MS. Die Prävalenz ist in beiden Hemisphären in den gemäßigten Zonen am höchsten und nimmt zum Äquator hin ab. Migrationstudien zeigen, dass Umweltfaktoren wie z.B. Infektionen während einer zeitlich begrenzten Periode in der Kindheit für die Pathogenese wichtig sind (Kurtzke, 2000b). Zusätzlich wurde gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen MS-Schüben und (unspezifischen) Virusinfektionen besteht (Andersen et al., 1993; Buljevac et al., 2002). Eine Beteiligung von Viren oder anderen, unbekannten exogenen Faktoren bei der Pathogenese der MS gilt als wahrscheinlich.

Hinweise für einen genetischen Einfluss auf die MS erhalten wir aus Familienstudien. Jeder sechste MS-Patient hat eines oder mehrere betroffene Familienmitglieder. Bei eineiigen Zwillingspaaren liegt die Konkordanzrate zwischen 21 und 31%, bei zweieiigen Zwillingen bzw. Geschwistern dagegen nur bei etwa 4% (Kinnunen et al., 1988; Mumford et al., 1994; Sadovnick et al., 1993). Eine kanadische Studie untersuchte die Häufigkeit der MS bei zusammenlebenden, nicht-biologischen (adoptierten) Verwandten. Es konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz bei nicht-biologischen Verwandten etwa so hoch ist wie in der Allgemeinbevölkerung, während leibliche Verwandte die erwartete, deutlich höhere Inzidenz aufwiesen (Ebers et al., 1995). Dies zeigt, dass die familiäre Häufung der MS genetisch bedingt ist.

Alle genetischen Untersuchungen zur MS legen eine multifaktorielle Vererbung nahe, bei der eine Vielzahl von Genen beteiligt ist. Einzig die Humanen Leukozyten Antigen (HLA)-Klasse II-Allele HLA-DRB1*1501 und DQB1*0601 konnten dauerhaft mit der MS bei Kaukasiern assoziiert werden (Dyment et al., 2004; Olerup & Hillert, 1991)

1.2 Therapie der Multiplen Sklerose

Die zur Zeit in der Praxis verwendeten Therapien versuchen, immunmodulatorisch auf die entzündlichen, demyelinisierenden und, bisher zum geringeren Teil, auf die degenerativen Prozesse der MS einzuwirken um ein Verlangsamen oder ein Beenden der autodestruktiven Vorgänge zu erreichen. Akute Schübe der RR-MS werden mit pulsweise eingesetzten hochdosierten Glukokortikosteroiden und gelegentlich mit Plasmapherese behandelt (Barkhof et al., 1991; Grauer et al., 2001).

Zur Schubprophylaxe wird in erster Linie Interferon- β , eine vielfältig immunmodulierend wirkende und wahrscheinlich IFN- γ antagonisierende Substanz verwendet (Jacobs et al., 1996). Der genaue Wirkmechanismus des Interferon- β bei der MS ist nicht bekannt. Einiges deutet daraufhin, dass die Substanz über verschiedene Angriffspunkte, unter anderem an peripheren T-Zellen, an der Blut-Hirn-Schranke, und an der Veränderung der Expression von MHC (Major histocompatibility complex)-Molekülen wirksam ist. In Deutschland sind drei Interferon- β -Präparate für die schubförmige MS zugelassen (Betaferon[®], Avonex[®] und Rebif[®]), darunter ist Betaferon[®] für die Behandlung der SP-MS zugelassen. Neben den Interferonen ist noch Glatirameracetat (Copaxone[®]) verfügbar, welches für die Therapie der RR-MS zugelassen ist. Hierbei handelt es sich um ein Random-Copolymer aus vier Aminosäuren, welche in hoher Zahl in Myelinbestandteilen vorkommen. Mit diesem Peptidgemisch konnten in verschiedene Entzündungsmodelle, darunter auch MBP- und PLP-getriggerte EAE, Krankheitssymptome unterdrückt werden. Ein möglicher Wirkmechanismus könnte darauf beruhen, dass Glatirameracetat mit PLP, MBP und MOG um die Bindung am MHC II-Rezeptor auf antigenpräsentierenden Zellen konkurriert (Hohlfeld, 1997). In einer doppel-blinden, plazebokontrollierten Phase-III Multizenter-Studie konnten Johnson KP et al. (1995) eine Schubreduktion bei der RR-MS unter Glatirameracetat-Therapie um etwa 29% zeigen (Johnson et al., 1995). Glatirameracetat zeigt darüber hinaus neuroprotektive Eigenschaften bei der Behandlung der MS (Chen et al., 2003).

Seit kurzem ist das Chemotherapeutikum Mitoxantron zur Therapie der MS zugelassen. Die Anwendung beschränkt sich aufgrund der Nebenwirkungen, speziell der Kardiotoxizität, auf rasch progrediente Verläufe der RR-MS und SP-MS, für deren Eskalationstherapie es eingesetzt wird. Unter Beachtung der kumulativen Höchstdosis und besonders der kardiologischen Kontraindikationen ist es als ein sicheres und

wirksames Medikament in der Therapie der MS anzusehen (Giovannoni, 2004; Gonsette, 2003; Hartung et al., 2002). Als Therapiemöglichkeiten der zweiten Wahl, mit weniger guter Evidenz, werden Azathioprin, intravenöse Immunglobuline bei der RR-MS, und Methotrexat bei der SP-MS empfohlen (Kieseier & Hartung, 2003).

1.3 Die Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis als Modell der Multiplen Sklerose

Die Entwicklung der EAE als Modell der MS begann nach Beobachtungen von akuten demyelinisierenden Episoden nach Rabies-Impfungen beim Menschen. Der Impfstoff war mit Myelinbestandteilen kontaminiert. Es lag nahe, eine Anti-Myelinantwort zu vermuten. Diese Hypothese konnte in Tiermodellen bestätigt werden. Durch Immunisierung mit Myelin-Antigenen und Freund'schem Adjuvans konnte in suszeptiblen Tieren Inflammation des ZNS herbeigeführt werden (Wekerle et al., 1994).

Bis heute wurde eine Vielzahl von Proteinen und Peptiden bei der EAE verwendet. Mit Ausnahme des Myelinassoziierten Glykoprotein (MAG) sind nahezu alle ZNS - Proteine (beispielsweise Myelinbasiertes Protein, Proteolipoprotein, Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein und α -B-Crystallin) fähig, eine EAE auszulösen. Für jedes dieser Myelinproteine variieren die enzephalitogenen Peptidsequenzen zwischen den verschiedenen suszeptiblen Tierstämmen (Petry et al., 2000).

In den letzten 30 Jahren haben sich Mäuse als besonders geeignet für die Untersuchung der EAE erwiesen. Hier sollen zwei besonders wichtige Stämme erwähnt werden. Die Lewis-Ratte und die SJL-Maus. In beiden Stämmen spielen CD4⁺ T-Zellen eine entscheidende Rolle.

Die Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) wird benutzt, um im Tiermodell verschiedene immunologische, histopathologische und therapeutische Aspekte der MS zu untersuchen. Verlauf und Auslösung der Erkrankung unterscheiden sich je nach Tierart oder Stamm. Die EAE ist eine oft monophasisch, in mehreren Modellen auch rezidivierend verlaufende, entzündliche und zum Teil demyelinisierende Erkrankung (Petry et al., 2000). CD4 positive T-Helferzellen (TH1) vom TH1-Typ, welche Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ), Tumornekrose Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-2 (IL-2) sezernieren, waren bisher am potentesten in der Lage, eine EAE zu induzieren, verglichen mit anderen myelinspezifischen T-Zellen (Ben Nun & Cohen,

1981; Zamvil & Steinman, 1990). Jedoch kann auch mit CD4+ T-Zellen vom TH2 Typ (Hemmer et al., 2002), sowie CD8+ T-Zellen (Huseby et al., 2001; Sun et al., 2001) und $\gamma\delta$ -T-Zellen (Gao et al., 2001; Rajan et al., 1998) eine EAE ausgelöst oder moduliert werden.

Vergleicht man die EAE mit der MS, so fällt auf, dass eine ausgeprägte Demyelinisierung nur in wenigen der Tiermodelle vorkommt und dann weitaus geringer ausfällt, aber von stärkerer Remyelinisierung gefolgt wird, als dies beim Menschen der Fall ist. Die EAE zeigt meistens eine Kurzzeit-Pathologie mit spontaner Erholung nach wenigen Wochen. Im Gegensatz dazu ist die MS eine chronische Erkrankung charakterisiert durch eine Anhäufung von Läsionen über Jahre hinweg, welche zu einer zunehmenden pathologischen Veränderung des ZNS führt (Petry et al., 2000).

Die unterschiedlichen Krankheitsverläufe und Pathologien der EAE kommen durch die Wahl verschiedener Tierarten bzw. Tierstämme und Induktionsarten zustande. Zu unterscheiden sind mehrere EAE-Modelle. Induziert werden kann die EAE bei suszeptiblen Tierstämmen durch Injektion von Myelin oder Myelinbestandteilen mit entsprechenden Adjuvantien (aktiv) oder durch Transfer enzephalitogener T-Zellen (adoptiv) (siehe Abb.1.1). Hierbei können myelinspezifische T-Zelllinien oder Klone verwendet werden (Petry et al., 2000).

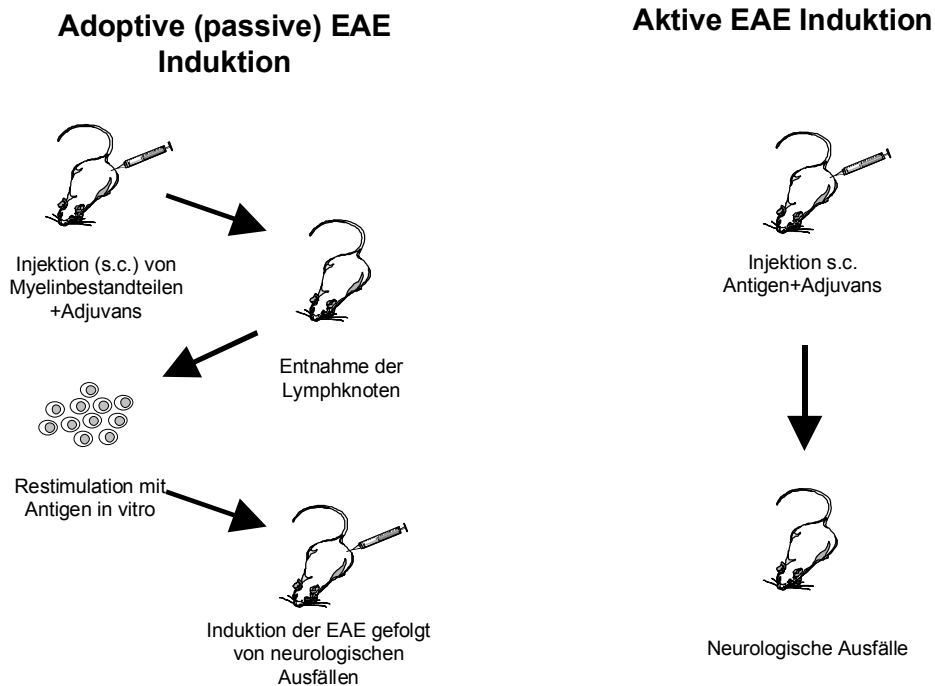


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der adoptiven und aktiven EAE-Induktion

Die klassische EAE der Lewis-Ratte, induziert mit Myelin basischem Protein (MBP), ist monophasisch. Die neurologischen Ausfallerscheinungen beginnen bei aktiver Immunisierung etwa am 10. Tag nach Induktion (bzw. 4-5 Tage bei passivem Transfer aktivierter T-Zellen von MBP/CFA (engl. complete Freund's adjuvans) immunisierten Spendern), mit anschließender Rückbildung der Symptomatik. Eine nochmalige Induktion mit MBP und Adjuvantien ist nicht möglich (Willenborg, 1979). In diesem Modell bieten die Induktions- und die Remissionsphase Möglichkeiten zu immunologischen, klinischen und histopathologischen Untersuchungen. Im Hirn und Rückenmark dieser Tiere findet man perivaskuläre mononukleäre Zellinfiltrate und wenig Demyelinisierung. Besonders enzephalitogen bei Lewis-Ratten ist das MBP vom Meerschweinchen, wohingegen humanes oder bovines MBP relativ inaktiv ist (Swanborg 1988).

Die EAE der SJL-Maus zeigt einen schubförmigen Verlauf, der an den relapsierend-remittierenden Verlauf der (humanen) MS erinnert. Eine Reinduktion der EAE ist bei SJL-Mäusen möglich. Aufgrund einer relativen Resistenz dieses Stammes gegen EAE,

ist die Induktion der Erkrankung schwierig, und es kommt häufig zu Variationen des Krankheitsbeginns und Ausprägung der Erkrankung. Die Histopathologie zeigt größere Ähnlichkeiten zur MS als dies bei der Lewis-Ratte der Fall ist: Neben den mononukleären Infiltraten zeigen die SJL-Mäuse deutliche Demyelinisierung (Martin et al., 1992a). Beim MBP werden enzephalitogene Epitope vorwiegend im C-terminalen Anteil des Moleküls (89-169) erkannt. Die bei anderen Mäusestämmen häufig dominante V β 8-Genfamilie ist bei diesem Stamm deletiert, ebenso die Expression des MHC-Moleküls I-E. Daher findet man mehrere V β -Ketten, die MBP89-101 erkennen können. Die Bindungsbereiche überschneiden sich hierbei, so dass es auf unterschiedliche Weise zu einer T-Zell-Bindung an dem Peptid MBP89-101 kommen kann. Das legt die Anwesenheit von verschachtelten Epitopen („nested epitopes“) im MBP89-101 nahe.

PLP ist ein 276 Aminosäuren langes Molekül, welches bei SJL-Mäusen die dominante enzephalitogene Komponente des ZNS zu sein scheint. So sind beispielsweise SJL-Mäuse, welche gegenüber PLP tolerisiert sind, gleichzeitig inert gegen eine Induktion mit Rückenmarkshomogenisat (MBP und PLP beinhaltend), wohingegen Mäuse, tolerisiert gegen MBP, keinem Schutz vor einer Induktion mit Rückenmarkshomogenisat unterliegen (Kennedy et al., 1990). Enzephalitogene Peptide des PLP sind für SJL: 104-117, 139-151 und 178-191 und das einzig verwendete MHC-Molekül ist I-A^S (Tuohy, 1994). Kuchroo et al. zeigten vor kurzem, dass SJL-Mäuse eine große Anzahl an PLP139-151-spezifischen T-Zellen im peripheren Repertoire haben, ohne an EAE erkrankt zu sein. Bei transgenen SJL-Mäusen gelang es erstmals, eine spontane EAE zu etablieren (Kuchroo et al., 2002).

Im Modell der EAE lassen sich einige Aspekte der MS des Menschen sehr gut simulieren. Dennoch bestehen einige Unterschiede zwischen der EAE und der MS, welche die Vergleichbarkeit einschränken. Die EAE ist ungeachtet dessen das beste Tiermodell, um unter kontrollierten Bedingungen besonders die immunologischen Fragestellungen zu prüfen und pharmakologische Untersuchungen zu unternehmen.

1.4.1 Dopaminagonisten

Dopaminagonisten werden in verschiedenen Bereichen der Medizin therapeutisch verwendet. Das wichtigste Anwendungsgebiet ist die Therapie des idiopathischen Parkinson Syndroms (IPS). Während des 19. Jahrhunderts wurde der erste Dopaminagonist, Apomorphin aus Morphin synthetisiert. Im Jahr 1884 wird die erste Veröffentlichung zum Apomorphingebrauch bei Parkinsonpatienten gemacht. 1951 konnte gezeigt werden, dass eine Apomorphingabe eine kurze, aber deutliche Besserung der Symptomatik bei IPS-Patienten verursacht, und 1965 konnte die strukturelle Ähnlichkeit von Apomorphin zu Dopamin bewiesen werden. Die meisten heute verwandten Dopaminagonisten sind synthetischer Herkunft und Abkömmlinge des Ergotamins. Während der 60-er Jahre wurden mehrere Prolaktininhibitoren entwickelt, unter anderem auch Bromocriptin, das 1967 zum ersten Mal beim Menschen getestet wurde. 1970 berichteten Fuxe und Hökfeld über die Fähigkeit von Bromocriptin, den Dopamin-Umsatz in hypothalamischen und nigrostriatalen Neuronen zu reduzieren, und 1973 konnten die dopaminagonistischen Eigenschaften von Bromocriptin von Corrodi et al. bestätigt werden. Ein Jahr später wurde die erste Studie zum Einsatz von Bromocriptin bei IPS-Patienten in Kombination mit L-Dopa veröffentlicht, und Bromocriptin wurde der erste, routinemäßig eingesetzte Dopaminagonist in der Parkinsontherapie (Tolosa et al., 1998).

1980 wurde Pergolid als ein weiterer Dopaminagonist beschrieben (Goldstein et al., 1980). Eine prospektive Doppelblindstudie (Olanow et al., 1994) zeigte Pergolid als ein wirksames Medikament in der Parkinsontherapie, welches den Bedarf des in Kombination gegebenen L-Dopas deutlich senken konnte. Pergolid wurde mit dem Handelsnamen Parkotil® 1993 in Deutschland eingeführt und für die Kombinationsbehandlung des IPS mit L-Dopa zugelassen. Seit einiger Zeit werden neuroprotektive und antioxidative Eigenschaften der Dopaminagonisten diskutiert. Damit haben sie bedeutende Vorteile gegenüber L-Dopa, das durch Entstehung von Spaltprodukten pro-oxidativ wirkt (Tolosa et al., 1998).

Die prolaktininhibitorischen Eigenschaften der Dopaminagonisten werden bei der Behandlung von Hyperprolaktinämien, wie sie z.B. bei Prolaktinomen auftreten, und zum Abstillen in der Geburtshilfe genutzt (Orrego et al., 2000; Akrivis et al., 2000;

Webster, 1996). Bei der Behandlung des Restless legs Syndroms konnten Dopaminagonisten wie Pergolid und Pramipexol erfolgreich eingesetzt werden (Stiasny et al., 2000; Weimerskirch & Ernst, 2001). Einige Therapieversuche wurden bei der Schizophrenie (Benkert et al., 1995), Depression (Izumi et al., 2000; Perugi et al., 2001) und Migräne (Herzog, 1997) unternommen.

Interessanterweise fanden Dopaminagonisten Anwendung bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) (Alvarez-Nemegyei et al., 1998) und der rheumatoiden Arthritis (RA) (McMurray, 2001).

1.4.2 Pharmakologie von Bromocriptin, Pergolid und Pramipexol

Die von uns untersuchten Dopaminagonisten Bromocriptin, Pergolid und Pramipexol unterscheiden sich voneinander in mehreren Eigenschaften. Chemisch kann man die ergolinen Derivate Bromocriptin und Pergolid von nicht ergolinen Medikamenten wie Pramipexol abgrenzen. Die Dopaminagonisten unterscheiden sich desweiteren in ihren Halbwertszeiten, Elimination und ihrer Bindungsaffinität und -aktivität zu dopaminergen und nicht-dopaminergen Rezeptoren.

Es werden fünf Dopaminrezeptoren unterschieden. Nach Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz, dem pharmakologischen Profil und der Signaltransduktion werden D₂, D₃, und D₄ Rezeptoren zur Gruppe der D₂-ähnlichen zusammengefasst, während D₁ und D₅ als D₁-ähnliche bezeichnet werden (Civelli et al., 1993).

In Experimenten mit Ovarzellen chinesischer Hamster, welche Dopaminrezeptorsubtypen von Ratten und Menschen exprimierten, konnte für Pergolid im Gegensatz zu allen anderen getesteten dopaminagonistischen Medikamenten eine deutliche Aktivität am D₁-Rezeptor gezeigt werden. Bromocriptin besitzt hauptsächlich Bindungsaffinität und Aktivität am D₂ und in etwa zehnfach geringerem Maße am D₃ Rezeptor. Bei Pergolid sind die Daten nicht übereinstimmend. Piercey et al. gehen von gleich starker Affinität zu D₂- und D₃- Rezeptoren, Perachon et al. dagegen von einer etwa achtfach höheren Affinität am D₃- gegenüber D₂-Rezeptor aus. Für Pramipexol wird eine deutlich höhere Affinität und biologische Aktivität am D₃- gegenüber dem D₂-Rezeptorsubtyp beschrieben (10-fach: Piercey et al., 1996; 72-fach: Perachon et al., 1999; 7-fach: Mierau et al., 1995).

Weiterhin zeigten elektrophysiologische Untersuchungen mit stereotaktisch in Rattenhirnen eingebrachten Elektroden (Substantia nigra pars compacta), dass nichtergoline Medikamente wie Pramipexol als volle Agonisten an Dopaminrezeptoren zu einer vollständigen Unterdrückung der Neuronen-Aktivitäts-Rate führten, wohingegen Pergolid und Bromocriptin als Partialagonisten beschrieben werden. Piercey et al. fiel auf, dass Bromocriptin und Pergolid zusätzlich, im Vergleich zu Pramipexol und anderen Dopaminagonisten, relativ hohe Affinitäten zu α_1 - und α_2 -Adrenorezeptoren haben. Dies wird als Ursache für unterschiedliche Nebenwirkungsprofile diskutiert (Piercey et al., 1996).

Pergolid hat von den drei Medikamenten die längste Halbwertszeit (HWZ). Die Angaben schwanken zwischen 7-16 Std. (Jost, 2000) und 27 Std. (Pezzoli et al., 1995) mit einer klinischen Aktivität von etwa 5-6 Std.. Dem folgen Pramipexol mit einer HWZ von 2-12 Std. (Rascol, 1999; Wright et al., 1997) und Bromocriptin mit HWZ von 3-6 Std. (Drewe et al., 1988). Im klinischen Gebrauch bei der Therapie des IPS haben sich folgende Äquivalenzdosen bewährt: Wird beispielsweise von Pergolid auf Pramipexol umgestellt, geschieht dies in einem Dosisverhältnis von 2:1, beim Umstellen von Bromocriptin auf Pramipexol 10:1. Pramipexol ist das potenteste der drei Medikamente.

Bromocriptin und Pergolid werden hauptsächlich über die Leber verstoffwechselt, Pramipexol nicht. Die Proteinbindung für Bromocriptin, Pergolid und Pramipexol beträgt etwa 95, 90 und 20% (Jost, 2000; Piercey et al., 1996).

Deutliche Nebenwirkungen zeigen sich besonders zu Beginn der Therapie mit Übelkeit und Erbrechen. Bei den nichtergolinen Derivaten wie Pramipexol kam es gehäuft zu Somnolenz und blitzartigen Schlafattacken. Insgesamt handelt es sich um gut untersuchte, zugelassene und sichere Medikamente.

1.4.3 Dopaminagonisten, Prolaktin und MS

Immunsuppressive Eigenschaften von Bromocriptin erregten erst kürzlich Aufmerksamkeit. Daten aus Transplantations-Studien deuten auf einen additiven Effekt von Bromocriptin in Kombination mit Immunsuppressiva, darunter CyclosporinA (CysA) in vivo hin (Clodi et al., 1997; Yongjin et al., 1997). In vitro zeigte Bromocriptin in Kombination mit CysA additive immunsuppressive Effekte auf T- und B-Zellen (Martinelli et al., 1996; Morikawa et al., 1994; Morkawa et al., 1993).

Bromocriptin wurde bei mehreren Autoimmunerkrankungen therapeutisch genutzt, darunter SLE, RA, seronegative Spondylarthritis, Morbus Reiter und Psoriasis-Arthritis (McMurray, 2001). Grundlage für diese Studien ist die Annahme, dass Prolaktin immunmodulierende Eigenschaften besitzt, sowie die Beobachtung, dass Prolaktin im Rahmen dieser Erkrankungen erhöhte Serumkonzentrationen aufwies. Obwohl gezeigt wurde, dass Bromocriptin als gut verträgliches Medikament möglicherweise effektiv als alternatives Therapeutikum bei Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden kann, gibt es wenig systematische, placebokontrollierte und verblindete Studien. Interessanterweise fielen die therapeutischen Effekte von Bromocriptin bei Autoimmunerkrankungen erstmals bei SLE-Patienten mit Bewegungsstörungen oder Prolaktinomen als Nebenbefund auf.

In einer doppel-blinden, placebokontrollierten Studie mit 66 SLE-Patienten führte Bromocriptin zu einer signifikanten Reduktion der Schübe verglichen mit der Kontrollgruppe. In beiden Gruppen war es den Patienten erlaubt, Prednison oder andere immunsuppressive Medikamente einzunehmen (Alvarez-Nemegyei et al., 1998).

Bei der Therapie der RA zeigen einige offene Studien eine Reduktion der Antigen- und Mitogen-Antworten mononukleärer Zellen aus dem peripherem Blut der Patienten und eine Besserung des klinischen Verlaufs (Figuerola et al., 1998; Figuerola et al., 1997; Mader, 1997; McMurray, 2001). Beim Morbus Reiter legen einige Fallbeschreibungen, und bei der Psoriasis-Arthritis eine offene Studie mit 35 Patienten einen möglichen Nutzen einer Bromocriptin-Therapie nahe (Bravo et al., 1992; Weber & Frey, 1986).

In einigen dieser Studien konnte gezeigt werden, dass erhöhte Serum-Prolaktinkonzentrationen mit der Erkrankung assoziiert waren, und dass eine Reduktion derselben durch Bromocriptin zu einer klinischen Verbesserung führte.

Im Tiermodell konnte man das Öfteren eine Assoziation zwischen erhöhten Prolaktinspiegeln und dem Krankheitsverlauf der EAE herstellen. Es konnte gezeigt

werden, dass erkrankte Ratten, verglichen mit Kontrollen, einen signifikant erhöhten Prolaktinwert haben, und dass die Behandlung mit Bromocriptin zu einer deutlichen Verbesserung des klinischen Krankheitsverlaufs führt (Dijkstra et al., 1994; Riskind et al., 1991). Diese Assoziationen des Serum-Prolaktinspiegels legt eine pathophysiologische Bedeutung dieses Hormons bei autoimmunen Prozessen nahe, bzw. ermöglicht zumindest eine medikamentöse Beeinflussung dieser Immunprozesse.

1.4.4 Dopaminagonisten in der EAE als Fragestellung

Dopaminerge Substanzen haben in einer Vielzahl von Untersuchungen ihre immunmodulierenden Eigenschaften gezeigt, mehrere Hypothesen versuchen die Wirkungsweise zu erklären. Die Ergebnisse sind jedoch zum Teil widersprüchlich und scheinen modell- und methodenabhängig zu sein.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, welche Effekte die drei Dopaminagonisten Bromocriptin, Pergolid und Pramipexol auf den Verlauf der EAE in der SJL-Maus und auf die Zytokinsekretion und Proliferation von Lymphozytenkulturen und enzephalitogenen T-Zellen haben.

1. Haben Dopaminagonisten einen Effekt auf den Verlauf der EAE in der SJL-Maus?
2. Gibt es Unterschiede zwischen den Medikamenten, speziell ergotamin- gegen nicht-ergotamin-Abkömmlinge?
3. Welche Wirkmechanismen sind wahrscheinlich?

2 Methoden

2.1 Reagenzien

Komplettes Medium bestand aus:

RPMI 1640

Fötale Kälberserum 10% vol/vol

Penicillin/Streptomycin 1% vol/vol

Nicht essentielle Aminosäuren 1% vol/vol

Natriumpyruvat 1% vol/vol

L-Glutamin 1% vol/vol

Hepes Puffer 1,3% vol/vol

Mercaptoethanol 0,1% vol/vol

Alle oben genannten Reagenzien erhielten wir von Gibco (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Californien, USA)

Die Zytokine wurden mit ELISA (engl.: enzyme linked immunosorbent assay) nach Herstellerprotokoll bestimmt. Reagenzien und ELISA-Kits von R&D Systems (Minneapolis, USA, www.rndsystems.com)

Die Antikörper (Ak) wurden in folgenden Konzentrationen verwendet:

Maus **TNF- α** : Primär-Ak 144 $\mu\text{g/ml}$, Sekundär-Ak 300 ng/ml

Maus **IFN- γ** : Primär-Ak 6 $\mu\text{g/ml}$, Sekundär-Ak 300 ng/ml

Maus **IL-2**: Primär-Ak, 1,2 $\mu\text{g/ml}$ Sekundär-Ak 300 ng/ml

Maus **IL-4**: Primär-Ak 4 $\mu\text{g/ml}$, Sekundär-Ak 200 ng/ml

Maus **IL-5**: Primär-Ak 2000 pg/ml, Sekundär-Ak 300 ng/ml

Maus **IL-10**: Primär-Ak 4 $\mu\text{g/ml}$, Sekundär-Ak 300 ng/ml

Die Sekundärantikörper waren biotinyliert. Nach Peroxidase- Konjugation mit alkalischer Phosphatase wurde die gebundene Zytokinmenge in einer Farbreaktion mit Substratlösung (Wasserstoffperoxid u. Tetramethylbenzidin) sichtbar gemacht und nach Stoppen der Reaktion mit 1M HCL im ELISA-Lesegerät bei 540 nm Wellenlänge gemessen. Die Konzentration wurde anhand der parallel mitlaufenden Standardkurven bestimmt (Zytokinstandards von R&D Systems).

Materialien für ELISA:

Waschpuffer: PBS (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, Californien, USA), 0,05% TWEEN 20, pH 7,3

Blockpuffer: PBS (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, Californien, USA), 1% BSA (Sigma-Aldrich, München) 5% Sucrose (Sigma-Aldrich, München), 0,05% NaN₃ (Sigma-Aldrich, München).

Verdünnungspuffer für Sekundär-Ak: 0,1% BSA, 0,05% TWEEN 20, Trispuffer 20 mM (Sigma-Aldrich, München), 0,9% NaCl bei pH 7,3

Peroxidase: HRP Zymed 1:20 000 (R&D Systems, Minneapolis, USA, www.rndsystems.com)

Substratlösung: Wasserstoffperoxid und Trimethylbenzidin 1:1 (R&D Systems, Minneapolis, USA, www.rndsystems.com)

2.2 Tiere

Wir verwendeten weibliche SJL-Mäuse (Harlan-Winkelmann, Borken, www.harlan-winkelmann.de), die zu Beginn der Experimente 7-8 Wochen alt waren. Tierhaltung und Durchführung der Experimente erfolgte nach den lokalen Richtlinien. Alle Tiere wurden in Temperatur-kontrollierten Räumen (Tierstall des Instituts für Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg) gehalten und mit Pressfutter und Wasser in beliebiger Menge ernährt. Die Immunisierung wurde in Kurznarkose mit 40 µl einer Mischung aus Rompun[®]/Ketanest[®] 9:1 durchgeführt.

2.3 Induktion und Verlaufsbeurteilung der EAE

Die EAE wurde mit einem etablierten adoptiven T-Zell-Transfer induziert (modifiziert nach Racke et al., 1991; Sommer et al., 1997).

PLP Peptid 139-151 mit der Sequenz HSLGKWLGHDPKF erhielten wir von Sigma-Genosys (Pampisford, Cambridgeshire, UK, www.genosys.com). PLP-spezifische T-Zellen in vivo generierten wir wie folgt: Jede Maus erhielt subkutan an vier Stellen, nahe den iliakalen und axillären Lymphknoten, in Kurznarkose eine Emulsion bestehend aus 100 µg PLP139-151 (1 mg/ml) in komplettem Freund'schem Adjuvans (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) substituiert mit 0,5 mg/ml inaktiviertem M. Tuberculosis H37RA im Verhältnis 1:1.

Nach 10 Tagen wurden die Tiere getötet, die drainierenden Lymphknoten entnommen und nach Homogenisierung und Waschen in Einzelzellsuspension in komplettes Medium gebracht. Auf die Antigenstimulation in vivo folgte die Restimulation mit PLP139-151 (10µg/ml) in vitro. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 3×10^6 Zellen pro ml (bei 2 ml je Napf) inkubiert. Nach 5 Tagen Zellkultur bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen gewaschen und in PBS aufgenommen, gezählt und anschließend intraperitoneal (i.p.) in Mengen zwischen $2,8 - 5 \times 10^6$ Zellen (je nach Versuch, s.u.) pro Maus injiziert (siehe Abb. 2.1). Daraufhin wurden die Tiere, welche alle einer Lieferung entstammten, randomisiert in verschiedene Gruppen aufgeteilt.

Die Injektion des Therapeutikums oder Placebos wurde an Tag 3 nach Transfer begonnen. Der Verlauf der Erkrankung wurde mit einer 5-Punkte-Skala beurteilt (Tabelle 1). Ein Versuch setzte sich aus einer Kontrollgruppe und einer oder mehreren Therapiegruppen jeweils zu 5-8 Mäusen zusammen.

In zwei Experimenten entnahmen wir Blutproben, um die Prolaktinkonzentration im Serum zu messen.

0	Keine Symptome
0,5	Schwanzspitzenparese
1	Komplette Schwanzparese
2	Leichte Paraparese distal
2,5	Durch Paraparese Haltungsreflexe eingeschränkt
3	Mittlere Paraparese, Bauchmuskulatur beteiligt.
3,5	Parese der Hinterbeine, Bauch liegt dem Boden auf.
4	Paraplegie oder Tetraparese
4,5	Tetraparese oder Tetraplegie + Inkontinenz
5	Moribund

Tabelle 1: Punktesystem zur Klinischen Einteilung des EAE-Verlaufs

Die Tiere wurden wiederholt stichprobenartig von erfahrenen Untersuchern beurteilt. (Dr. A. Bittner, Dr. S. Nessler, H. Baran).

2.4 Histologie

Die Mäuse erhielten eine tödliche Dosis (100 µl) Rompun®/Ketanest® (9:1). Der Brustkorb wurde eröffnet und eine Kanüle in die linke Herzkammer eingebracht, der rechte Vorhof eröffnet und nun antegrad mit PBS für 5 Minuten gespült. Anschließend perfundierten wir mit Paraformaldehyd (1%) für 10–15 min.

Das Gehirn und Rückenmark wurde in Wirbelsäule und Schädel belassen, vom übrigen Körper getrennt und in 4%ige Paraformaldehydlösung eingelegt und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Schnitte und Färbungen wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. C. Stadelmann (Neuropathologie, Universität Göttingen) angefertigt. Inflammation, Demyelinisierung und axonaler Schaden wurden mit Hämatoxylin/Eosin, Luxol-Fast-Blue Färbung und Bielschowsky's Silberimprägnation dargestellt. Das Ausmaß der Entzündung wird durch die Anzahl der inflammatorischen Infiltrate pro spinalem Querschnitt dargestellt (inflammatorischer Index). Ein Minimum von 10 spinalen Querschnitten wurde pro Maus untersucht. Da sich offensichtlich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, bei gleicher Krankheitsaktivität, zeigten, wurde von einer statistischen Darstellung abgesehen.

2.5 Bromocriptin, Pergolid und Pramipexol

Bromocriptin und Pergolid bezogen wir von Sigma (www.sigma-aldrich.com), Pramipexol wurde uns freundlicherweise von Boehringer-Ingelheim (www.boehringer-ingelheim.de) zur Verfügung gestellt. Die Medikamente wurden, um die Löslichkeit zu verbessern, ähnlich wie vorbeschrieben (Bendele et al., 1991; Francis et al., 1994) als Pulver in 1%iger Tabarell®-Lösung (Sanorell, Baden) in Wasser gelöst und bei –20°C bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt.

2.6 Zellkulturexperimente

2.6.1 Zytokine und Proliferation der polyklonalen Lymphknotenzellen

Den SJL-Mäusen wurde, analog zur EAE-Induktion, eine PLP139-151/CFA-Emulsion subkutan injiziert. Die drainierenden Lymphknoten wurden nach 10 Tagen entnommen und nach Homogenisierung und Waschen in Einzelzellsuspension in komplettes Medium gebracht. Zur Restimulation in vitro wurde PLP139-151 (10µg/ml) als Antigen verwandt.

Die Medikamente wurden in absteigenden Konzentrationen (10^{-5} – 10^{-10} M) mit frischen Lymphknotenzellen (4×10^6 /ml) von SJL-Mäusen für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Überstände abgenommen und bis zum weiteren Gebrauch bei –20°C eingefroren.

Alle erforderlichen Verdünnungen wurden mit 1%iger Tabarell-Lösung (s.o. Sanorell, Baden) vorgenommen.

Die Zytokine wurden wie unter 2.1 beschrieben bestimmt.

Im Proliferationsassay inkubierten wir 5×10^4 Zellen pro Napf in 96er Flachbodenplatten mit PLP139-151 (10µg/ml) und dem entsprechenden Medikament (in gleichen Konzentrationen wie im Zytokinassay) à 200µl für 40 Std. Nach Zugabe von 0,4 µCi (14,8 kBq) [³H]-TdR-Thymidin (40µl/Napf) wurde für weitere 8 Std. inkubiert. Die Zellen wurden durch Absaugen auf ein Filter geerntet, nach Trocknung mit Szintigraphielösung benetzt und in die inkorporierte Aktivität in einem Szintilationszähler (TopCount, Canberra Packard, Dreieich) je Napf bestimmt. Die Werte wurden aus Tripletbestimmungen gemittelt.

2.6.2 Zytokine und Proliferation der Klonzellen

Mit den Klonzellen wurde ähnlich wie mit den frischen Lymphknotenzellen verfahren. Zusätzlich gaben wir Antigen-Präsentierende Zellen (APC) hinzu (2×10^6 /ml). Hierzu verwendeten wir Milzzellen der SJL-Maus. Wir entnahmen die Milz nach Tötung der Maus mittels zervikaler Dislokation, und brachten sie, nach Homogenisierung und Waschen in Einzelzellsuspension in komplettem Medium. Mit einer subletalen Dosis Strahlung (30 Gy) schädigten wir die Zellen, um eine Proliferation derselben auszuschließen.

In diesen Assays wurde ein TH0-Klon (3-1) und ein TH2-Klon (3-3) in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml verwendet.

Die Zellen wurden mit Antigen (PLP139-151) und dem jeweiligen Medikament für 48 Stunden inkubiert (37°C / 5% CO_2). Überstände wurden abgenommen und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C eingefroren.

Die Zytokine der Klonzellen wurden wie unter 2.1 beschrieben bestimmt.

Das Proliferationsassay wurde wie unter 2.6.1 beschrieben durchgeführt. Die Konzentrationen der Klonzellen und der APC waren $2 \times 10^5/\text{ml}$ und $2 \times 10^6/\text{ml}$.

2.6.3 T-Zell-Klone

Die beiden verwendeten Klone waren zuvor mittels Durchflusszytometrie und ELISA gut charakterisiert worden (S. Nessler, persönliche Kommunikation).

Bei dem Klon 3-1 handelt es sich um einen enzephalitogenen TH0-Klon. In der Durchflusszytometrie zeigte der TZ-Rezeptor die $\text{V}\alpha$ -Kette 17 und die $\text{V}\beta$ -Kette 14. Im Zytokin-ELISA nach 48 Std. Inkubation mit $10\mu\text{g}$ PLP und ohne Stimulation maßen wir folgende Werte (Angaben in pg/ml):

	10 μg PLP	ohne PLP
IL-2	658	0
IL-4	226	44
IL-5	8178	188
IL-10	840	41
TNF- α	323	0
IFN- γ	355	0

Dies entspricht einem TH0-Muster .

Der Klon 3-3 zeigte in der Durchflusszytometrie folgende TZ-Rezeptor-Ketten: $\text{V}\alpha$ 13-2 / $\text{V}\beta$ 2. Im ELISA nach 48 Std. Inkubation mit $10\mu\text{g}$ PLP und ohne Stimulation maßen wir folgende Werte (Angaben in pg/ml):

	10 µg PLP	ohne PLP
IL-2	Unter der Nachweisgrenze	
IL-4	180	21
IL-10	5918	0
TNF- α	1154	0
IFN- γ	Unter der Nachweisgrenze	

Dies entspricht einem TH2-Muster.

2.7 Prolaktinbestimmung

Die Blutentnahme wurde durch examinierte Tierpfleger durchgeführt. Die Tiere wurden mit 100 µl Rompun[®]/Ketanest[®] (9:1) getötet und über das Auge entblutet. Das Blut wurde in 1 ml-Tubes gesammelt, bei 6500 rpm und 4°C zentrifugiert, die Überstände abgenommen und bei -20°C gelagert. Die Proben wurden auf Trockeneis an Dr. A.F. Parlow (Harbour-UCLA Hormone Institute CA/USA) geschickt. Dort wurde mit Radio-Immunsorbent Assay das Serum Prolaktin bestimmt (Parlow, 2004).

2.8 Statistik

Verwendet wurden der zweiseitige Mann-Whitney-Test und der Kruskal-Wallis-Test. Das Signifikanzniveau betrug 0,05.

3 Ergebnisse

3.1 In vivo Experimente

Die Induktion der EAE erfolgte wie oben beschrieben (modifiziert nach Racke et al., 1991; Sommer et al., 1997). Die EAE der SJL-Maus zeigt einen rezidivierenden Verlauf, den wir bis zu 60 Tage lang verfolgten. Die Mäuse erlitten zumeist zwei Krankheitsschübe. Der erste Schub begann innerhalb der ersten 10 Tagen nach T-Zell-Transfer. Die Mäuse erholten sich bis Tag 30, um im Anschluss einen zweiten Schub zu erleiden, der in der Regel schwächer ausgeprägt war als der erste.

Insgesamt wurden sieben Experimente durchgeführt. Um die Krankheitsausprägung auf mittlerem Niveau zu optimieren, wurden die transferierten Zellzahlen in aufeinanderfolgenden Experimenten variiert. Aufgrund der methodisch bedingten Schwankungen in der Ausprägung der Krankheitssymptome wurden Experimente mit ähnlichem Krankheitsverlauf und vergleichbar hohen EAE-Scores in zwei Gruppen zusammengefasst (Gruppe A und B).

Zwei dieser Experimente wurden wegen methodischer Probleme (zu schwere Krankheitssymptome bei den meisten Tieren) nach wenigen Tagen beendet und wurden nicht weiter berücksichtigt.

In Abb. 3.1 sind die Experimente der Gruppe A zusammengefasst. Der Krankheitsbeginn variiert zwischen Tag 6 und 13. Die Mäuse der Kontrollgruppe erleiden einen ersten starken und einen zweiten etwas schwächeren Schub. In der Grafik sind deutliche Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen im klinischen Score zu erkennen. Besonders zwei Gruppen, behandelt mit Bromocriptin 20 mg/kg und mit Pergolid 20 mg/kg, zeigten eine geringere Krankheitsausprägung und damit niedrigere klinische Scores als die Kontrollen. Bei beiden Gruppen war der Mittelwert der klinischen Scores des ersten Schubs, also der Akutphase, reduziert. Der Krankheitsbeginn der Pergolid-Gruppe (20 mg/kg) fand geringfügig später statt als in den Vergleichsgruppen. Um Tag 30 erholten sich die Mäuse etwas, und die beiden vorgenannten Gruppen zeigten besonders erniedrigte Werte im klinischen Score im Vergleich zu den Kontrollen. Die Pergolid-Gruppe (20 mg/kg) zeigte für einige Tage sogar eine Vollremission ohne Krankheitsresiduen (Scorewert 0). Die Therapiegruppe

mit Pramipexol zeigte ebenfalls leicht reduzierte klinische Scores. Um die Therapiegruppen mit den Kontrollen zu vergleichen, wählten wir die Maximalscores des ersten und zweiten Schubs aus.

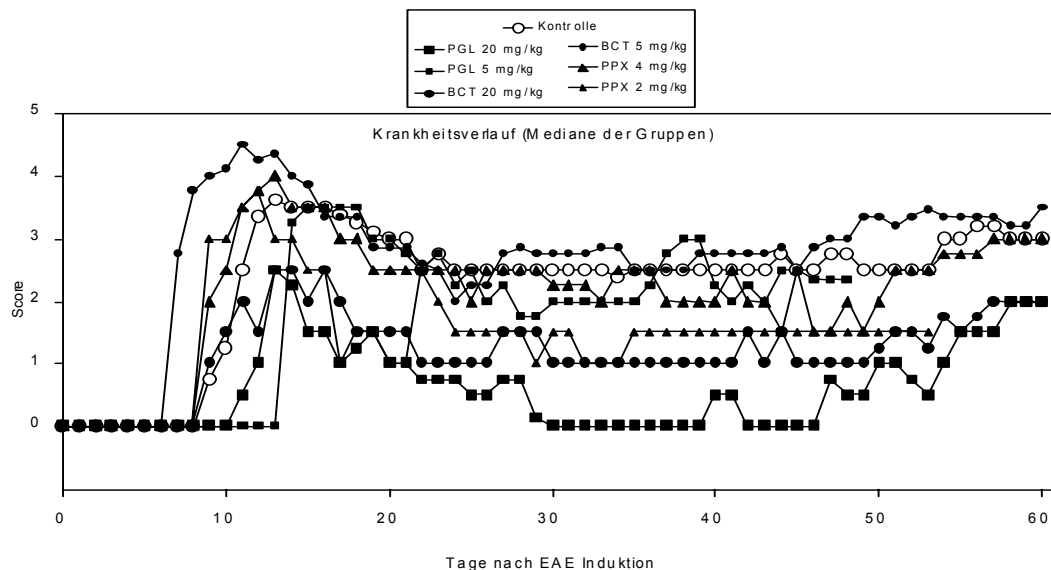


Abb. 3.1: EAE-Experimente der Gruppe A. Medikamente und Dosierungen siehe Legende, BCT: Bromocriptin, PGL: Pergolid, PPX: Pramipexol

Abb. 3.2 a) zeigt, dass die mit 20 mg/kg Pergolid behandelte Gruppe signifikant ($p = 0.004$) niedrigere Maximalwerte als die Kontrolle aufweist. Die mit 20 mg/kg Bromocriptin behandelten Mäuse zeigen eine gering signifikante ($p = 0,049$) Reduktion der Maximalscores. Die anderen Gruppen zeigen keine signifikanten Veränderungen (siehe Abb. 3.2 a) im Vergleich zu den Kontrollen. In Abb. 3.2 b) sieht man, dass während des zweiten Schubs die Maximalscores der beiden Gruppen Pergolid 20 mg/kg ($p = <0,001$) und Bromocriptin 20 mg/kg ($p = 0,007$) signifikant unter den Werten der Kontrollen liegen. Die restlichen Gruppen, behandelt mit der niedrigeren Dosis Pergolid (5 mg/kg) und Bromocriptin (5 mg/kg), sowie beide Dosierungen mit Pramipexol zeigten keine signifikanten Veränderungen der Maximalscores verglichen mit Kontrollen (siehe Abb.3.2 b).

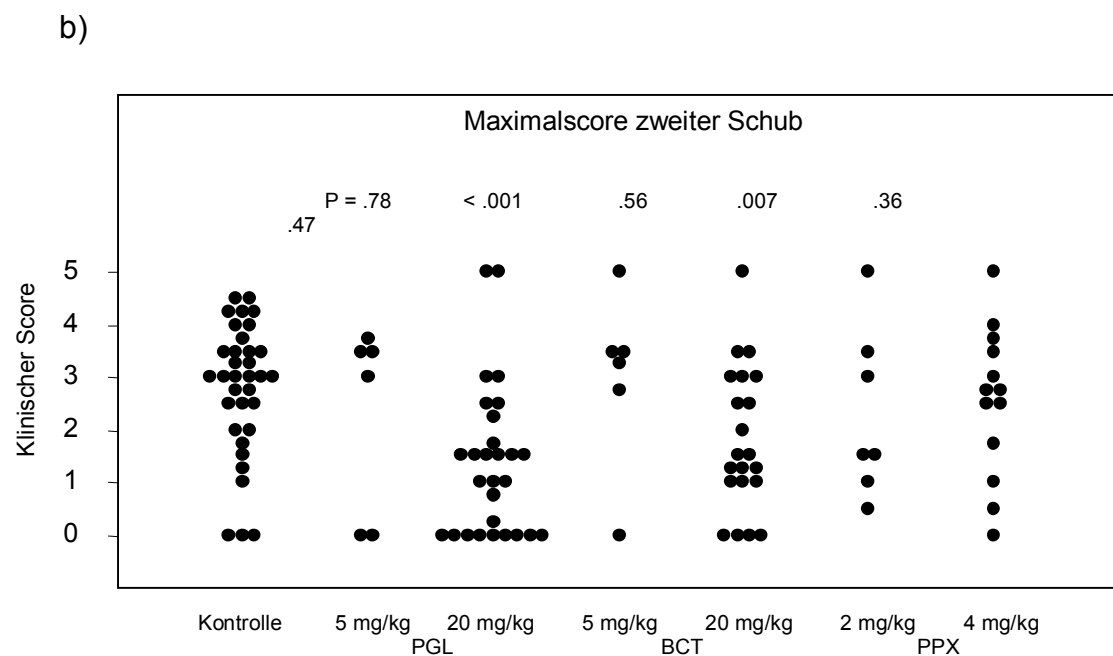
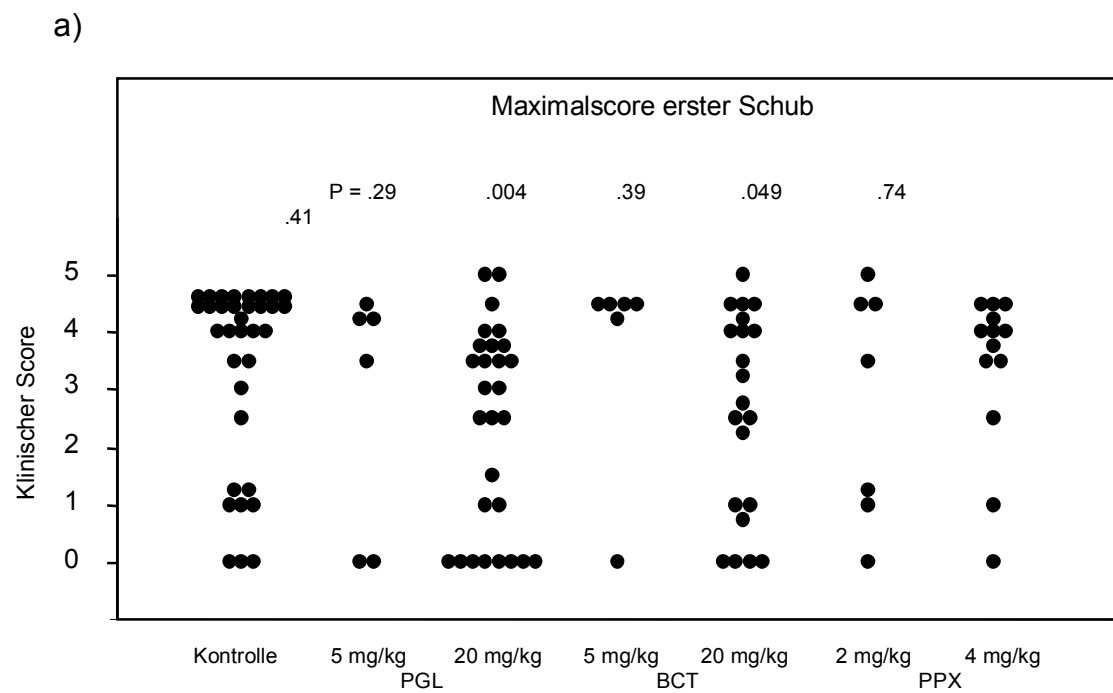


Abb. 3.2: a) erster (in den ersten 30 Tagen) und b) zweiter Schub der Gruppe A. Jeder

Punkt repräsentiert den Maximalscore einer Maus. Die p-Werte ergaben sich durch Berechnung im zweiseitigem Mann-Whitney Test.

In Abb. 3.3 ist der Krankheitsverlauf der Experimente der Gruppe B dargestellt. Man sieht, dass die Mediane der Therapiegruppen Bromocriptin (20 mg/kg) und besonders deutlich Pergolid (20 mg/kg) unter denen der Kontrollen liegen. Die mit Pergolid behandelten Tiere waren in der Akutphase im ersten Schub klinisch nicht so stark erkrankt wie die Kontrolltiere, erholten sich schneller und vollständiger vom ersten Schub, und zeigten einen nur schwach ausgeprägten zweiten Schub. Die Therapiegruppe mit Pramipexol zeigte einen ähnlichen Krankheitsverlauf wie die Kontrollgruppe.

Nach Berechnung der Maximalscores zeigte die Pergolid-Gruppe (20mg/kg) signifikant ($p = 0,005$) erniedrigte Werte im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 3.4). Alle anderen Versuchsgruppen zeigten keine signifikanten (BCT $p = 0,61$, PPX 2 mg/kg $p = 0,54$; PPX 4 mg/kg $p = 0,49$) Abweichungen von den Kontrollwerten.

Die Maximalscores aller Therapiegruppen (Abb. 3.4) sind, verglichen mit den Kontrollen im Kruskal-Wallis-Test, signifikant erniedrigt ($p = 0,01$).

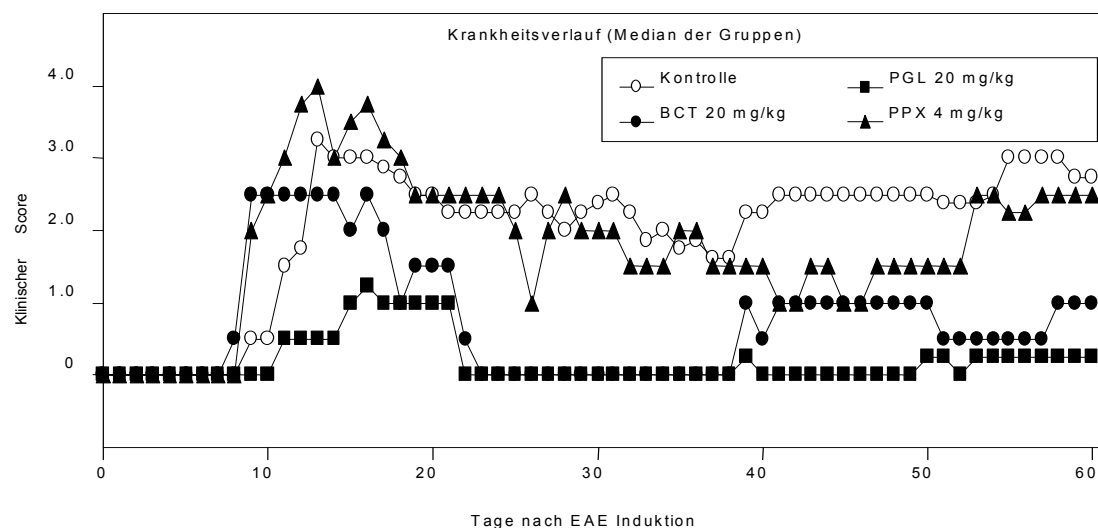


Abb. 3.3: EAE-Experimente der Gruppe B. Dosierungen und Medikamente siehe Legende.

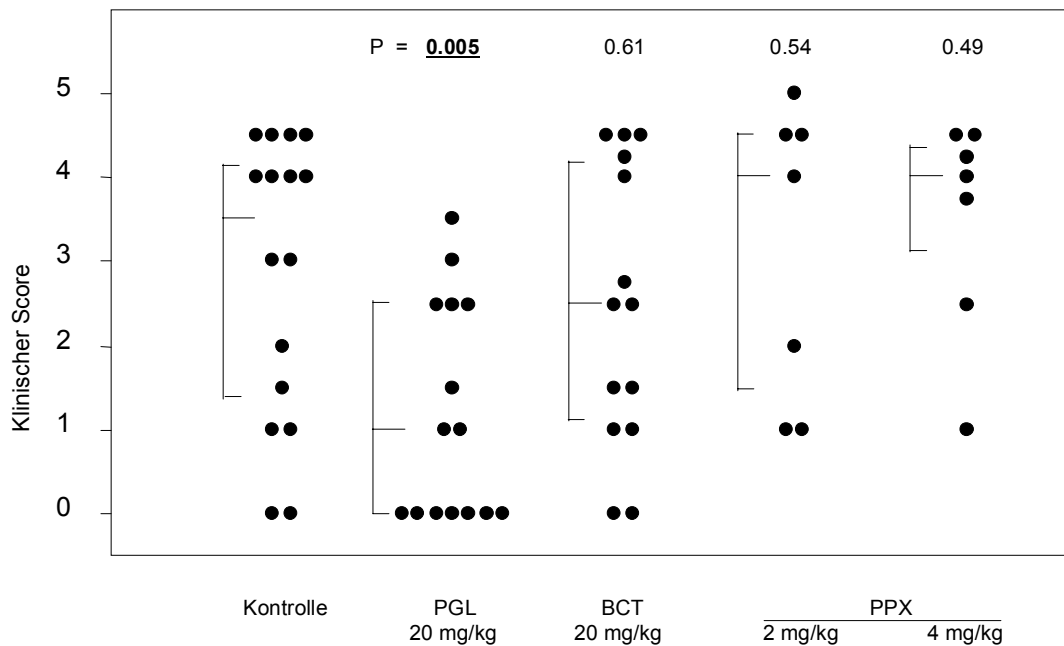


Abb. 3.4: Experimente der Gruppe B. Gezeigt sind die Maximalwerte einzelner Mäuse, die 25%, 50%, 75% Quartile für jede Behandlungsgruppe und die p-Werte für jede Gruppe im zweiseitigen Mann-Whitney Test im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Alle Therapiegruppen verglichen mit der Kontrollgruppe ergaben im Kruskal-Wallis Test ein $p = 0,01$.

Zwei Autoren berichteten bereits darüber, dass mit Dopaminagonisten der Verlauf der EAE bei der Lewis-Ratte positiv beeinflusst werden kann und zeigten damit, dass diese immunsuppressives Potential besitzen (Dijkstra, van der Voort, et al. 1994; Riskind, Massacesi, et al. 1991). Dies bestätigte sich in unseren Versuchen in der EAE der SJL-Maus.

Ungeklärt blieb, welcher Wirkmechanismus für die beobachteten Effekte verantwortlich ist und welchen Einfluss das Hormon Prolaktin in diesem Versuchsaufbau hat, welches die beiden Gruppen um Riskind und Dijkstra als Haupteffektor beschrieben haben.

Um Veränderungen des Prolaktins zu erfassen, bestimmten wir in zwei Versuchen das Serum-Prolaktin. In Abb. 3.5 sieht man die Einzelergebnisse der Mäuse. Die Serum-Prolaktinwerte aus der mit Pergolid (20 mg/kg) behandelten Gruppe sind signifikant ($p = 0,039$) niedriger als die der Kontrollen. Vergleicht man die Prolaktinwerte der Therapiegruppen insgesamt mit denen der Kontrolle, so ergibt sich ein signifikant ($p = 0,019$) niedrigerer Wert.

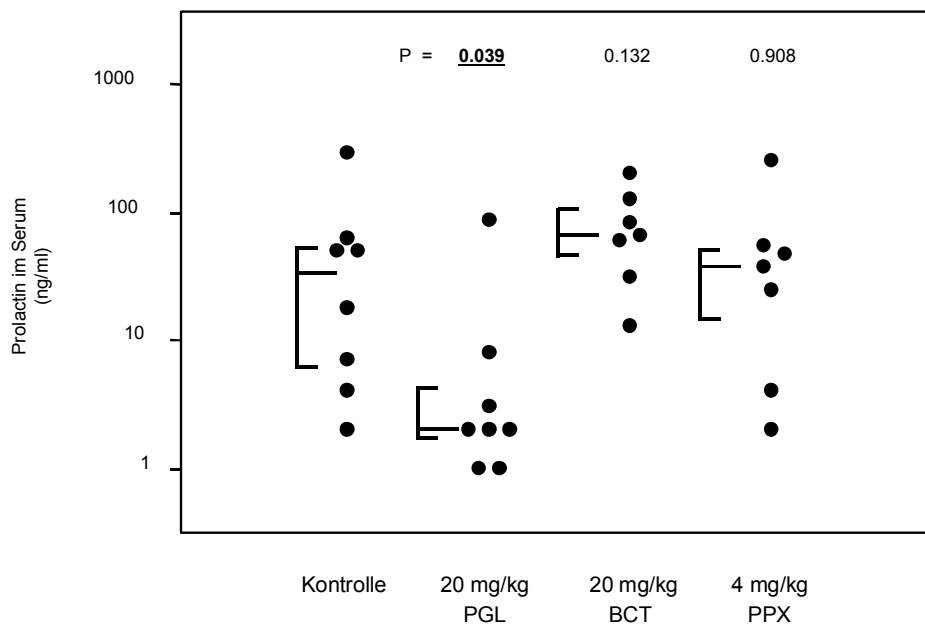


Abb. 3.5 Prolaktin Konzentrationen im Serum von einzelnen Mäusen. Gezeigt sind die 25%, 50%, 75% Quartile für jede Behandlungsgruppe und die p-Werte für jede Gruppe im zweiseitigen Mann-Whitney Test im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Alle Therapiegruppen verglichen mit der Kontrolle im Kruskal-Wallis Test ergeben ein $p = 0.019$.

Zusammenfassend zeigte sich, dass klinisch signifikante Verbesserungen im EAE Score nur in den Therapiegruppen mit den höheren Dosierungen von Bromocriptin (20mg/kg) und Pergolid (20mg/kg) erreicht wurden, leichte Verbesserungen bei den niedrigeren Dosen. Das Serum-Prolaktin war bei der hochdosierten Pergolid-Therapiegruppe (20mg/kg) erniedrigt.

3.2 In vitro Experimente

In den Zellkulturexperimenten wurde versucht, die Wirkung der drei Substanzen Bromocriptin, Pergolid und Pramipexol auf T-Zellen zu charakterisieren.

Die Experimente wurden mit frischen, polyklonalen Lymphozyten und T-Zellklonen durchgeführt. Verwendet wurden, wie oben beschrieben, ein TH2-Zellklon (Klon 3-3) und ein TH0-Zell-Klon (Klon 3-1). Der Klon 3-1 hat in vorangegangenen Versuchen

gezeigt, dass mit ihm in SJL-Mäusen eine starke EAE induziert werden kann. Die polyklonalen T-Zellen entsprechen den Zelllinien, die zur Induktion der EAE in den in vivo Experimenten verwendet wurden. Wir führten, wie oben beschrieben, Zellkulturexperimente durch und bestimmten Proliferation und Zytokinproduktion. Jede Versuchsreihe wurde zwei bis dreimal durchgeführt. Jedem Proliferationsassay ist eine Versuchsreihe an Zytokinassays zugeordnet. Die Ergebnisse aus beiden Tests werden zusammen bewertet. Die gemessene Zytokinkonzentration im Überstand ist abhängig von der Sekretion der einzelnen Zelle und von der Zellzahl insgesamt, welche durch Proliferation verändert wird. Jede Kurve im Diagramm zeigt den Verlauf eines Zellkulturansatzes mit einem Medikament in verschiedenen Konzentrationen.

In Abb. 3.6 ist je ein repräsentatives Zellkulturexperiment gezeigt. Lediglich geringfügige Veränderungen der Zytokinkonzentrationen konnten gemessen werden. Bis zu einer Konzentration von 1 μM kam es zu keinen wesentlichen Veränderungen der in vitro gemessenen Parameter.

Die Proliferation des Klon 3-1 wurde durch die Behandlung mit den drei Medikamenten nicht beeinflusst. Bei hohen Dosen (10 μM) kam es zu Suppression von IFN- γ unter BCT, von IL-2 unter BCT und PPX und von IL-10 unter PGL. Die Sekretion von TNF- α , IL-5 und IL-4 (Daten nicht gezeigt) wurde nicht beeinflusst.

In Zellkulturexperimenten mit polyklonalen Lymphozyten kam es bei hoher Dosierung (10 μM) zu einer geringfügigen Verminderung der Proliferation besonders unter Bromocriptin und geringer ausgeprägt unter Pramipexol. Die Sekretion von IFN- γ , und IL-10 in geringem Maße, wurde bei einer Dosis von 10 μM durch Bromocriptin und in kleinem Umfang durch Pergolid supprimiert.

Die gemessenen Konzentrationen von TNF- α und IL-4 wurden nicht beeinflusst.

Experimente mit dem TH2 Klon 3-3 ergaben weitgehend identische Ergebnisse und sind daher hier nicht separat gezeigt.

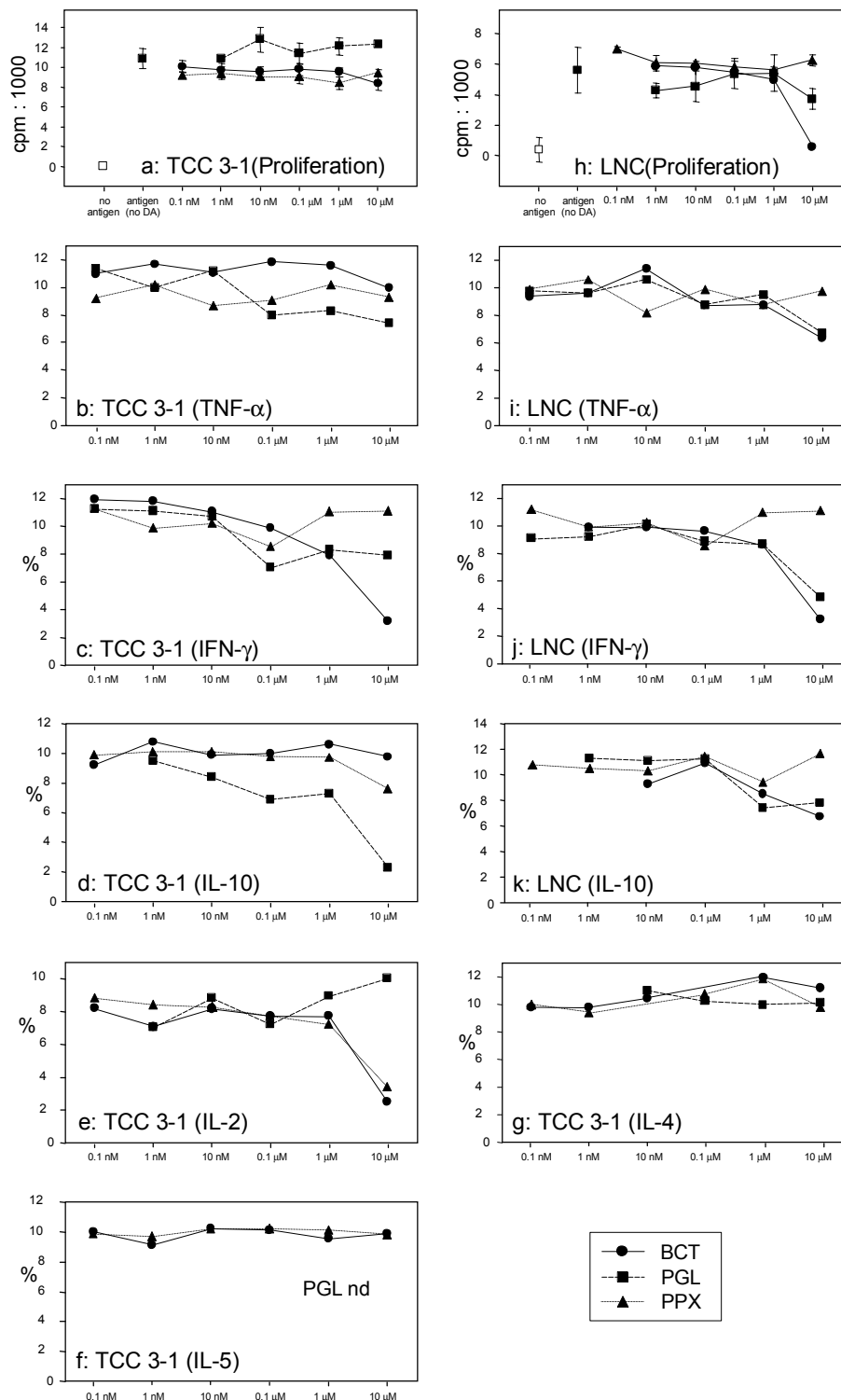


Abb. 3.6: Repräsentative Proliferations- und Zytokinassays: **a-g** T-Zell-Klon 3-1, **h-k** polyklonale Lymphknotenzellen. Jede Kurve entspricht einem Experiment mit einer Substanz (Bromocriptin = BCT, Pergolid = PGL, Pramipexol = PPX). Nd = nicht durchgeführt.

3.3 Histologie

Um die klinischen Veränderungen im EAE-Verlauf weiter zu charakterisieren, fertigten wir in Zusammenarbeit mit Prof. C. Stadelmann histologische Schnitte von Rückenmark und Gehirn der Mäuse an Tag 60 nach EAE-Induktion an. Die histologischen Untersuchungen zeigten typische Veränderungen für die adoptive EAE, die mit der Krankheitsausprägung korrelierten. Es zeigten sich zelluläre Infiltrate, Demyelinisierung, Schaumzellen und axonale Schäden, die typischerweise in heterogener Weise über das gesamte ZNS mit Schwerpunkt auf das Rückenmark verteilt waren. Wir konnten keine grundlegenden Unterschiede in den mit Dopaminagonisten behandelten Mäusen im Vergleich mit den Kontrollen feststellen.

Es ist davon auszugehen, dass es zu diesem späten Zeitpunkt bei allen Gruppen, bei einer starken Krankheitsausprägung der dargestellten Tiere an Tag 60 (Score 3-3,5) und nach zwei abgelaufenen klinischen Krankheitsschüben, bereits zu einer zu großen Destruktion des Gewebes gekommen ist und damit feinere Unterschiede nicht mehr erkennbar waren.

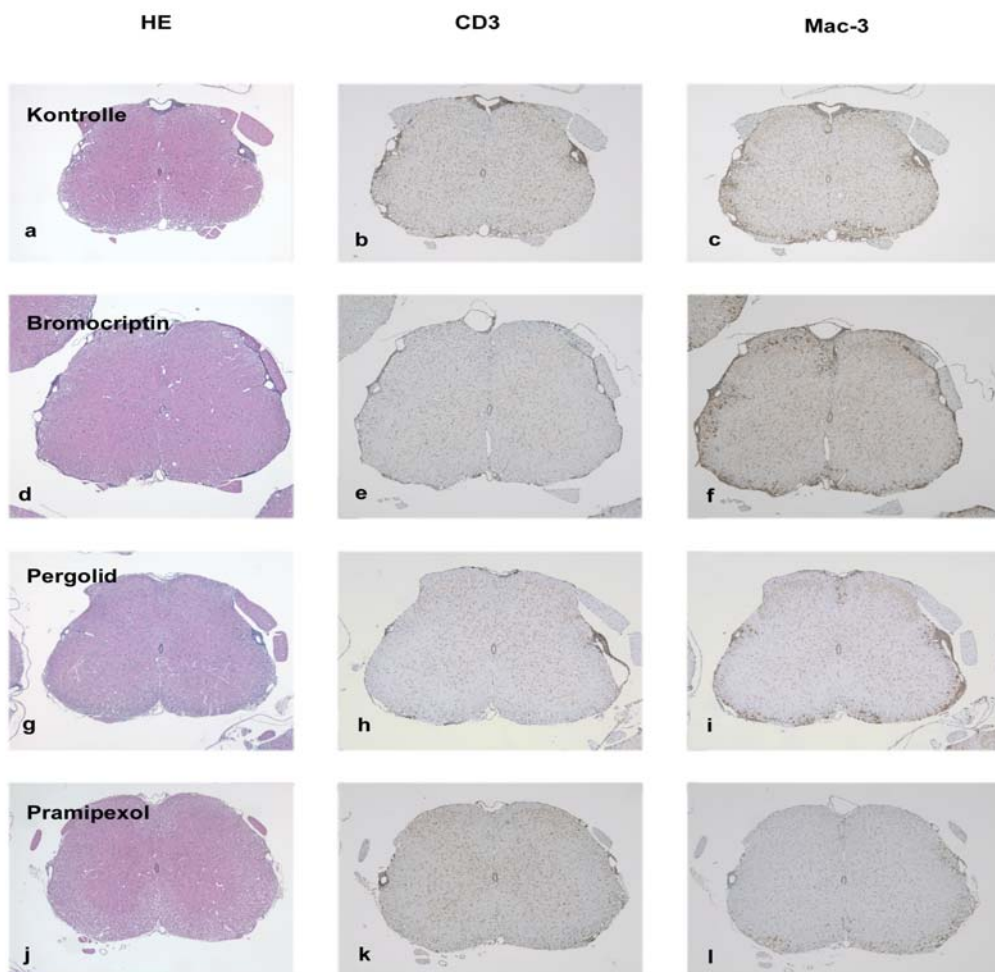


Abb. 3.7: In den mit Bromocriptin, Pergolid und Pramipexol behandelten Tieren zeigt sich im Vergleich mit den Kontrollen kein Unterschied in Bezug auf Ausmaß und Zusammensetzung der entzündlichen Infiltrate. In der HE-Färbung (a, d, g, j) sind schaumzellige Infiltrate vorwiegend im Bereich der Hinter- und Seitenstränge sowie perivaskuläre meningeale Infiltrate zu erkennen. Die perivaskulären Infiltrate bestehen vorwiegend aus CD3-positiven T-Zellen (b, e, h, k) und Mac-3-positiven Makrophagen (c, f, i, l). Die Schaumzellen im Parenchym exprimieren den Makrophagenmarker Mac-3 (c, f, i, l). Vergrößerung: 40x

4 Diskussion

4.1 Prolaktin, Dopamin und Autoimmunerkrankungen

Ziel dieser Arbeit war es, die immunsuppressiven Eigenschaften von Dopaminagonisten beispielhaft in der EAE, einem Modell der Multiplen Sklerose zu charakterisieren. Wir konnten einen positiven therapeutischen Effekt von Dopaminagonisten auf die klinische und histologische Ausprägung der Erkrankung zeigen. Dies wurde begleitet von einer Reduktion des Hypophysenhormons Prolaktin.

Im Folgenden sollen die Bedeutung der Dopaminagonisten mit besonderem Augenmerk auf das darunter regulierte Hypophysenhormon Prolaktin und seine Wirkung auf das Immunsystem diskutiert werden.

Dopaminagonisten konnten im Rahmen experimenteller Therapien bei einer Reihe von Erkrankungen erfolgreich eingesetzt werden (s. Kapitel 1.4.1). Dopamin und Dopaminagonisten wie Bromocriptin, Pergolid und Pramipexol haben eine Vielzahl von Angriffspunkten (s. Kapitel 1.4.2). Zum Beispiel hemmen sie die Freisetzung von Prolaktin aus der Adenohypophyse. Aufgrund dieser Fähigkeit wird Dopamin synonym „Prolaktin inhibierendes Hormon“ genannt. Interessant ist diese Tatsache, da Untersuchungen der vergangenen Jahre zeigen konnten, dass endokrine Faktoren mit einer Vielzahl von autoimmunen Erkrankungen assoziiert sind. Mehrere Studien konnten eine Störung der hypothalamisch-hypophysär-adrenalen Achse in Assoziation mit autoimmunen Erkrankungen aufzeigen. Kortisol ist beispielsweise unter Ruhebedingungen und in Stimulationstests bei MS-Kranken erhöht und korreliert in gewisser Weise mit dem Krankheitsstadium (Heesen et al., 2002b; Michelson et al., 1994; Then et al., 1999). Stress und damit verbundene Erhöhungen des Kortisolspiegels konnten in einigen Studien mit der Exazerbationen der MS assoziiert werden (Li et al., 2004; Mohr et al., 2004). Diese Ergebnisse werden derzeit diskutiert und müssen noch bestätigt werden.

Weitere endokrinologische Untersuchungen haben wiederholt eine Beteiligung von Prolaktin, oder einen positiven therapeutischen Effekt prolaktininhibitorischer Substanzen (wie Bromocriptin) an rheumatischen oder potentiell autoimmunen Erkrankungen wie M. Reiter, SLE sowie MS nahegelegt (McMurray, 2001). Die RA und die MS konnten in einigen Studien mit einer Erhöhung des Prolaktinspiegels assoziiert werden (Heesen et al., 2002a; Azar et al., 1999; Kira et al., 1991; Reder &

Lowy, 1993). Zusätzlich zeigen sowohl MS als auch RA post partum, d.h. bei einem Anstieg des Prolaktins, eine Verschlechterung/Exazerbation des Krankheitsverlaufs (Barrett et al., 2000; Confavreux et al., 1998). Die Schwangerschaft hat einen deutlichen Einfluss auf den Verlauf der MS. Confavreux et al. beschrieben in einer prospektiven Studie mit 254 MS-Patientinnen den Krankheitsverlauf ein Jahr vor und nach Geburt. Während der Schwangerschaft kam es zu einem Rückgang und in den ersten drei Monaten post partum zu einer Erhöhung der Schubrate, welche anschließend wieder auf das Niveau vor der Geburt absank. Auch wenn keine Assoziation der Schubfrequenz mit Stillen gezeigt werden konnte, korreliert sie mit dem hohen Anstieg des Prolaktins post partum. Dies konnte in weiteren Studien bestätigt werden (Vukusic et al., 2004; Salemi et al., 2004; Confavreux et al., 1998). Darüber hinaus besteht gleichzeitig eine negative Korrelation zwischen Schubrate und erhöhten Östrogenspiegeln. Während der Schwangerschaft steigen die Konzentrationen im Serum von Östrogenen an. Post partum kommt es zu einem abrupten Abfall des Östrogenspiegels. Die hohe Östrogenkonzentration im Serum schwangerer MS-Patientinnen könnte einen positiven Effekt auf die Krankheitsaktivität haben und zu einer Schubreduktion führen. Östrogene wurden mit Erfolg therapeutisch in der EAE eingesetzt. Bei beiden Geschlechtern konnte der Ausbruch der EAE verhindert werden und die Sekretion inflammatorischer Zytokine gehemmt werden (Palaszynski et al., 2004). Diese Ergebnisse lassen auf eine eventuelle Anwendung von Östrogenen bei der Therapie der MS hoffen.

Die Variation der Schubfrequenz während und nach der Schwangerschaft scheint von einer komplexen Feinmodulierung des Immunsystems abhängig zu sein. Während der Schwangerschaft kommt es zu einer Verschiebung des TH₁/TH₂ Verhältnis zugunsten von TH₂ mit einer Verstärkung der humoralen Immunantwort. Post partum kommt es zu einer Zunahme des TH₁-Musters (Al-Shammri et al., 2004). Diese Daten könnten auf eine mögliche Assoziation zwischen erniedrigter Inzidenz von MS-Exazerbationen während der Schwangerschaft und einem schwangerschaftsinduzierten TH₂-Muster hindeuten. Welches Hormon während der Schwangerschaft für den Effekt zuständig ist, ist nicht geklärt. Prolaktin scheint hier seine besondere Rolle in einer Verstärkung eines TH₁-Musters zu haben. Prolaktin verstärkt die Differenzierung von Monozyten in dendritische Zellen und erhöht die Sekretion von IL-12, welches die Differenzierung von TH₀- zu TH₁-Lymphozyten unterstützt (Matera et al., 2001). Dies führt im Weiteren zu einer Erhöhung inflammatorischer Zytokine (Matera et al., 1999 u. 2000) und einer Verstärkung der zellulären Immunantwort (Matera et al., 2004). Dies könnte

zumindest über eine Verstärkung der inflammatorischen Aspekte einen negativen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der MS ausüben und eventuell zu der erhöhten Schubrate bei der MS post partum beitragen.

Die oben erwähnten Hormone scheinen jedoch auch unabhängig von einer Schwangerschaft Immunfunktionen maßgeblich zu beeinflussen. Auffallend ist in diesem Zusammenhang besonders der auffällige Unterschied in der Inzidenz einer Reihe von Autoimmunerkrankungen zwischen Männern und Frauen. Bei der SLE und autoimmunen Thyrioiditiden beträgt das Verhältnis Frauen/Männer über 4:1, bei der Myasthenia gravis 6-7/2 und bei der MS etwa 1,5-2/1. Diese Differenzen bei Autoimmunerkrankungen sind zumindest teilweise auf endokrine Faktoren zurückzuführen (Whitacre, 2001). Frauen reagieren beispielsweise auf eine Infektion viel wahrscheinlicher als Männer mit einer TH1-Antwort, ausgenommen ist davon die Zeit der Schwangerschaft (s.o.). Dies könnte durch niedrige Konzentrationen von Östrogen und, durch die bei Frauen im Vergleich zu Männern, höheren Prolaktinwerte unterstützt werden. Hohe Spiegel an Testosteron, Progesteron und auch Östrogenen hingegen unterstützen ein TH2-Muster, welches eher einen protektiven Effekt auf die meisten Autoimmunerkrankungen hat (Whitacre et al., 1999). Diese Befunde unterstützen die Vermutung, dass das Sekretionsmuster mehrerer Hormone für Unterschiede in Inzidenz und Ausprägung bestimmter autoimmuner Erkrankungen beiträgt.

Prolaktin wird insgesamt bei diesen Studien als aktivierender Faktor des Immunsystems beschrieben (Übersicht in Straub et al., 2000). Unter Verwendung von Dopaminagonisten ist es möglich, die Freisetzung von Prolaktin, und damit dessen immunaktivierende Wirkung zu reduzieren, und auf diese Weise therapeutisch nutzbare Effekte auf inflammatorische Erkrankungen auszuüben.

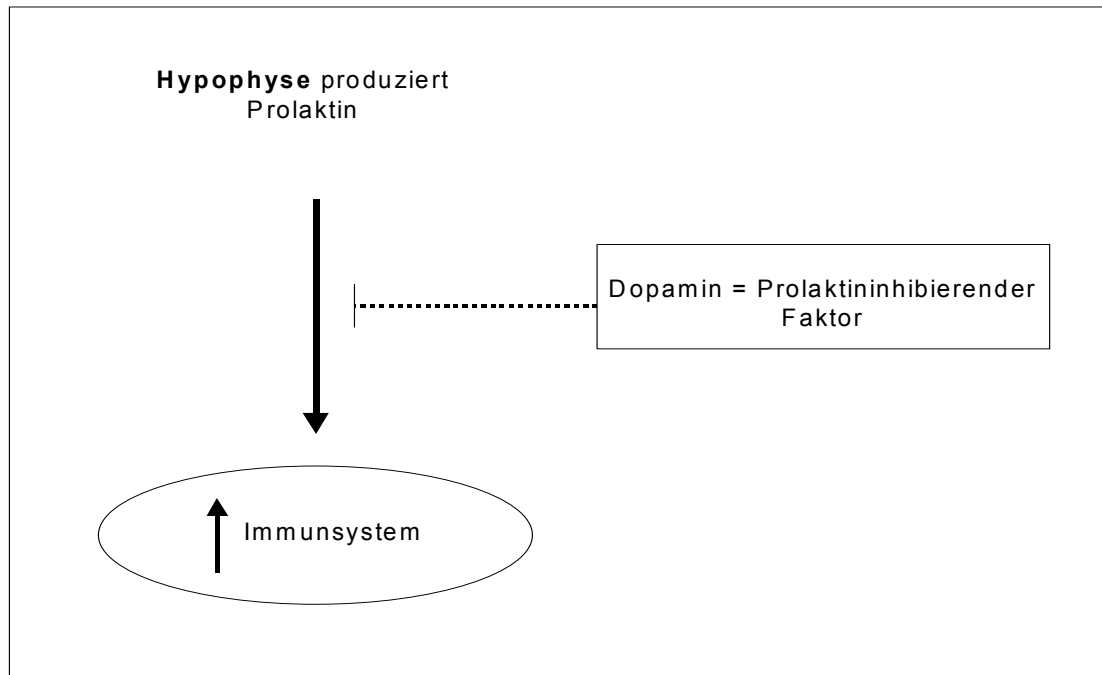


Abb.4.1 Schematische Darstellung der Wirkung von Prolaktin und Dopamin auf das Immunsystem.

Immunmodulierende Effekte von Dopaminagonisten sind vielfach beschrieben worden, der genaue Mechanismus ist in den einzelnen Untersuchungen jedoch ungeklärt, und die Ergebnisse sind teilweise widersprüchlich. Einige Studien im Tiermodell beschäftigten sich mit diesem Thema, ohne ein einheitliches Ergebnis zu erzielen. Die Hauptfrage ist, ob direkte Effekte auf Lymphozyten, indirekte über Erniedrigung des Prolaktins, oder beide Mechanismen für die therapeutischen Effekte in diesen Studien verantwortlich sind. Dies ist auch bei unseren Versuchen in der EAE ein zentrales Thema, sodass dies im Weiteren erläutert werden soll.

Einige Autoren postulieren direkte Effekte der dopaminergen Substanzen, ohne Beteiligung des hypophysären Prolaktins, auf das Immunsystem (Bendele et al., 1991; Morikawa et al., 1994; Morkawa et al., 1993; Panajotova, 1997), andere wiederum legen eine indirekte Wirkungsweise, durch eine Supprimierung von Prolaktin, nahe (Neidhart, 1997; Riskind et al., 1991; Dijkstra et al., 1994).

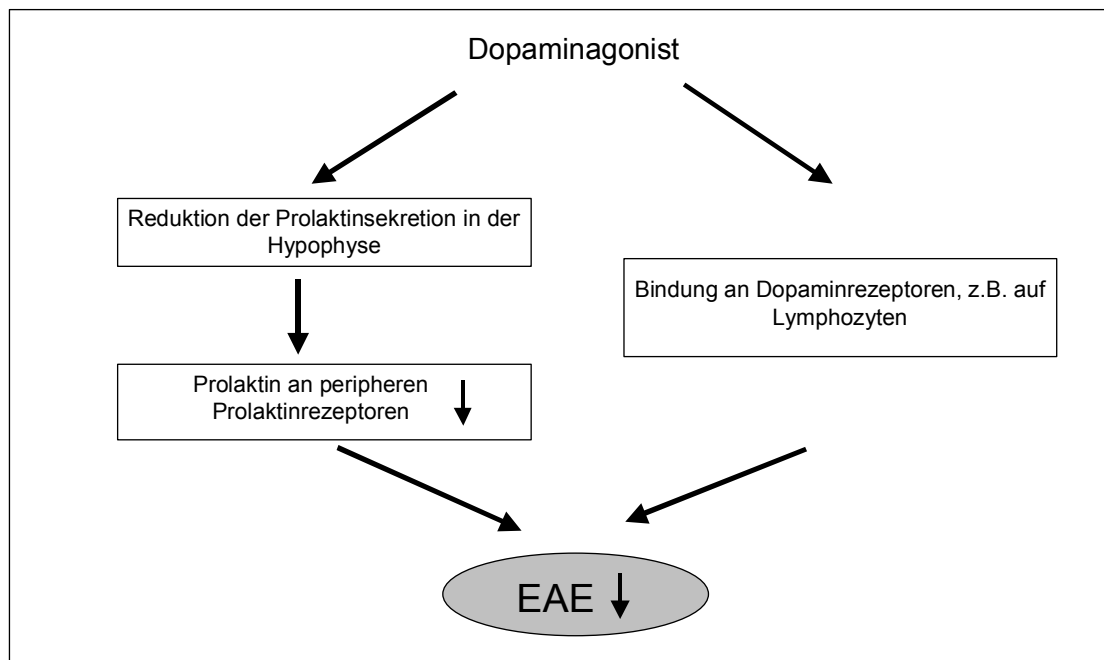


Abb.4.2: Schematische Darstellung möglicher Wirkmechanismen der Dopaminagonisten in der EAE.

Im Mausmodell konnte bisher nicht gezeigt werden, ob Dopaminagonisten wie Bromocriptin, Pergolid und Pramipexol über direkte Bindung an Dopaminrezeptoren auf Lymphozyten eine Funktion ausüben. Unsere Daten (S. Nessler, Manuskript in Vorbereitung) deuten auf das Vorkommen von D₁-Rezeptoren in geringer Frequenz auf Lymphozyten der SJL-Maus hin, sie scheinen jedoch keinen wesentlichen Einfluss auf die EAE in unseren Versuchen zu haben (vgl. Abb. 3.6).

In Lymphozyten der Ratte konnte mRNA von Dopaminrezeptoren mit reverser Transcriptase-Polymerase Ketten Reaktion (rt-PCR) nachgewiesen werden (Caronti et al., 1998), so dass theoretisch direkte Effekte von Dopaminagonisten über Dopaminrezeptoren in dieser Spezies möglich sind.

Beim Menschen konnten Levite et al. in Bindungsassays mit den Dopaminagonisten Bromocriptin und Pergolid zeigen, dass über D₃- und D₂-Dopaminrezeptoren humane T-Zellen aktiviert werden können. Diese Autoren zeigten einen Anstieg der Bindung von humanen T-Zellen zu Fibronectin via $\alpha 4\beta 1$ - und $\alpha 5\beta 1$ -Integrin (Levite et al., 2001). Ob es dadurch zu einer generellen Aktivierung der Lymphozyten kommt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. In Studien mittels Durchflusszytometrie

konnte die Existenz von D₅- und D_{2.4}-Rezeptoren auf der Oberfläche humaner Lymphozyten, nicht aber D₁-Rezeptoren nachgewiesen werden (McKenna et al., 2002). In einigen in vitro Experimenten und Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass dopaminerge Substanzen eine Bedeutung bei der Supprimierung immunologischer Funktionen haben. So können Dopamin und L-Dopa die mitogeninduzierte Proliferation humaner mononukleärer Zellen im peripheren Blut unterdrücken (Bergquist et al., 1994). Morikawa et al. zeigten, dass Bromocriptin die Proliferation von humanen B- und T-Zellen sowie die Immunglobulinsekretion von B-Zellen in vitro hemmen kann. Dies erklärten sie mit einer beobachteten Reduzierung der IL-2-Sekretion. In beiden Untersuchungen konnten sie, mittels Radioligand-Bindungsassays (Nachweisgrenze 0,3 ng/ml), kein Prolaktin in den Lymphozytenkulturen nachweisen. Sie schlossen daraus, dass die beobachteten Effekte nicht über eine Beeinflussung des Prolaktinspiegels, sondern auf direktem Wege zustande kamen (Morikawa et al., 1994; Morikawa et al., 1993). Panajotova et al., zeigten neben einer herabgesetzten Proliferation unter Dopaminrezeptoragonisten eine Reduktion der IL-2-Sekretion und der klonalen Expansion von T-Zellen in vitro (Panajotova, 1997). In einem Modell zur Untersuchung von Abstoßungsreaktionen in der Maus testeten Panajotova et al. verschiedene dopaminerge Substanzen. In vitro und in vivo konnte die Abstoßungsreaktion (engl. graft versus host reaction) mit Pergolid reduziert werden. Aufgrund der in vitro-Daten schließen Sie auf einen nicht-prolaktinabhängigen Wirkmechanismus in der Maus. Interessanterweise konnten sie in ihren Assays keine D₁- und D₂-Rezeptoren auf Lymphozyten detektieren.

Bendele et al. berichteten über direkte Effekte von Pergolid auf den Verlauf eines entzündlichen Ödem-Modells in der Ratte. Anti-inflammatorische Effekte konnten mit niedrigen Dosen an Pergolid, nicht jedoch mit Bromocriptin erreicht werden. In einer Reihe von Versuchen mit verschiedenen Agonisten und Antagonisten an parasymphatischen, symphatischen und dopaminergen Rezeptoren kommen sie zu dem Ergebnis, dass die Hauptwirkung in diesem Modell über zentrale D₂-Rezeptoren und α_2 -adrenerge Rezeptoren zustande kommt. Durch das unterschiedliche Bindungsverhalten von Bromocriptin und Pergolid an Dopamin- und adrenerge Rezeptoren ist die Differenz im Therapieeffekt in diesen Modellen erklärbar. Durch Versuche mit adrenaletomierten Lewis-Ratten, konnte eine Beteiligung von Kortikosteroiden weitestgehend ausgeschlossen werden. Bei länger andauernder Gabe von Pergolid, fiel zudem eine deutliche Toleranzentwicklung auf (Bendele et al., 1991).

Weitere Ergebnisse zur Untersuchung der immunsuppressiven Eigenschaften von Dopaminagonisten stammen aus transplantationsmedizinischen Experimenten und lassen auf therapeutische Anwendungen beim Menschen hoffen.

In verschiedenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Bromocriptin in der Kombination mit dem Immunsuppressivum Cyclosporin A (CysA) zumeist im Sinne eines additiven Effektes zur Verzögerung der Transplantatabstoßung beitragen kann. Erfolgsversprechende Ergebnisse beim Menschen präsentierten Yongjin et al. in einer kleinen Studie bei nierentransplantierten Patienten (Yongjin et al., 1997). Additive immunsuppressive Wirkungen der Dopaminagonisten wurden im Tierversuch mit Hunden (Yilmaz et al., 1998), in Versuchen mit der Ratte (Wilner et al., 1990), und in der Zellkultur (Morikawa et al., 1994; Morkawa et al., 1993) beschrieben.

Interessanterweise scheint auch Prolaktin bei der GVHR eine Rolle zu spielen. Untersuchungen hatten gezeigt, dass Prolaktin mit CysA an Prolaktinrezeptoren auf Lymphozyten um die Bindung konkuriert und diese antagonisiert. Dies könnte einen Teil der immunsuppressiven Wirkung von CysA durch eine Reduktion der aktivierenden und proliferationsfördernden Eigenschaften von Prolaktin erklären. Darüber hinaus könnte dies jedoch einen Wirkungsverlust von CysA bei hohen Prolaktinspiegeln bewirken (Russell et al., 1985).

Prolaktin ist ein überaus vielseitiges Hormon, welches über eine Reihe von Mechanismen Effekte auf das Immunsystem ausüben kann. Dies von besonderer Bedeutung, da wir in unseren Versuchen – unter Verabreichung von Dopaminrezeptoragonisten - eine Reduktion von Prolaktin bei gleichzeitiger klinischer Verbesserung im EAE-Modell zeigen konnten, was einen immunregulatorischen Effekt von Prolaktin nahe legt. Einige dieser Ergebnisse hierzu sollen im Folgenden diskutiert werden.

Prolaktin ist mit großer Homologie zwischen den Spezies ein besonders gut konserviertes Hormon. Die Unterschiede beschränken sich lediglich auf kleinere Unterschiede in Länge und Glykosylierung. Darüber hinaus existieren hypophysäre und extrahypophysäre Formen von Prolaktin. Prolaktin wird in Lymphozyten und in fast jedem anderen Gewebe gebildet, und Prolaktinrezeptoren befinden sich ubiquitär auf nahezu jeder Zelle in verschiedenen Spezies (Matera, 1996). Prolaktinrezeptoren kommen beim Menschen (Matera et al., 1992; Russell et al., 1985), der Ratte (Nagy et

al., 1983a; Nagy et al., 1983b; Russell et al., 1984) und in der Maus (Gagnerault et al., 1993) in lymphatischem Gewebe speziell auf T- und B-Zellen vor.

Prolaktin zeigt Ähnlichkeiten mit anderen Hormonen, darunter das Wachstumshormon GH (engl. growth hormone), und Zytokinen, darunter IL-2. Prolaktin scheint ehemals zusammen mit dem GH durch eine Duplikatur eines Gens entstanden zu sein. Der Prolaktinrezeptor gehört der Gruppe der Zytokin-Klasse 1-Rezeptor Superfamilie an. Aus Experimenten mit Zelllinien, darunter Nb2-Lymphoma-Zellen, die Prolaktinrezeptoren in besonders hoher Zahl tragen, sind Einzelheiten zum Prolaktinrezeptor und der nachfolgenden Signalkaskade in der Zelle bekannt. Prolaktin bindet in zwei Schritten an seinen Rezeptor, zuerst mit einer Bindungsstelle an ein Rezeptormolekül, um anschließend mit einer anderen Bindungsstelle ein weiteres Molekül zu binden. Durch die Dimerisierung wird die assoziierte Janus Kinase (meist JAK2), eine Tyrosinkinase, aktiviert. Neben anderen Molekülen scheint vor allem die sog. Stat-Familie (engl. Signal transducer and activator of transcription) an der Signalkaskade beteiligt zu sein, darunter Stat5, dieses bildet einen wichtigen Faktor in der Signaltransduktion von beispielsweise GH und IL-2. IL-2 nimmt als aktivierendes und proliferationsförderndes Zytokin eine kritische Rolle in der Immunmodulation ein und hat einen mitogenen Effekt auf Lymphozyten. Im Weiteren wird der mitogene Effekt von Prolaktin und IL-2 über die Aktivierung der gleichen Gene (c-myc, c-fos, Ornithin-Decarboxylase und Interferon regulatory factor-1) vermittelt (Matera, 1996). Die Ähnlichkeit in Herkunft, verwendeter Signalkaskade, und teilweise in der Funktion, zwischen Prolaktinrezeptor und einigen Zytokinen bekräftigt die möglicherweise kritische Rolle von Prolaktinrezeptoren und seinen Liganden für das Immunsystem (Bole-Feysot et al., 1998; Goffin et al., 1998; Matera, 1996; Murphy et al., 1992).

Bisher ist von über 300 unterschiedliche Wirkungen von Prolaktin in verschiedenen Spezies berichtet worden. Darunter hat Prolaktin Einfluss auf die Regulierung des Wasserhaushalts, Wachstums und Entwicklung, Endokriniums und Metabolismus, Gehirns und Verhaltens, Immunregulation, und nicht zuletzt als wichtigste Funktion, Effekte auf die Reproduktionsmechanismen (Bole-Feysot et al., 1998).

Wie entscheidend Prolaktin für die Reproduktion ist, lässt sich aus Beobachtungen von Prolaktin-Rezeptor-Defizienten-Mäusen ersehen, die vielfach in ihren Funktionen eingeschränkt sind und als homozygote infertil sind (Ormandy et al., 1997).

Prolaktin ist involviert in Wachstum und Differenzierung des Lymphatischen Systems (Gagnerault et al., 1993). Prolaktin ist mitogen, und in der Zellkultur kann dieser Effekt durch anti-Prolaktin-Antikörper blockiert werden (Clevenger et al., 1990; Hartmann et al., 1989). Hypophysectomierte Ratten besitzen eine supprimierte Immunfunktion und diese ist durch Gabe von Prolaktin wieder herstellbar. Die protektiven Effekte, die durch die Administration von Prolaktin bei der hypophysectomierten Ratte erreicht wurden, konnten durch die zusätzliche Gabe von Prolaktin-Antiserum aufgehoben werden (Nagy et al., 1983b; Nagy & Berczi, 1978 u. 1991). Trotz dieser Evidenzen scheinen Prolaktin- und Prolaktin-Rezeptor-defiziente Mäuse ein funktionsfähiges Immunsystem zu haben (Steger et al., 1998; Bouchard et al., 1999). Diese Entdeckungen lassen vermuten, dass Prolaktinrezeptor-abhängige Mechanismen für die Immunmodulation in vivo bedeutend, jedoch nicht essentiell sind.

Insgesamt sind die Schnittstellen zwischen dem Hormon Prolaktin und dem Immunsystem vielseitig. Alles deutet darauf hin, dass Prolaktin einen wichtigen Einfluss auf das Immunsystem hat, diese Mechanismen aber zumindest teilweise redundant geregelt sind. Prolaktin scheint im Rahmen einer feinen Abstimmung zwischen hypophysärem und peripherem Prolaktin bei verschiedenen Konzentrationsbereichen bidirektionale Effekte auszuüben. Dies lässt sich jeweils nur ansatzweise in in vitro Experimenten untersuchen. Die Reaktivität antigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen konnte unter Zugabe von Prolaktin bei physiologischen (12-20 ng/ml) Prolaktinkonzentrationen gesteigert werden, bei supraphysiologischen Konzentrationen (200 ng/ml) kam es jedoch zu einer Hemmung derselben (Matera et al., 2004). Die IL-10-Sekretion von peripheren Blutzellen in vitro unter Stimulation von Lipopolysaccharid ist bei hohen Prolaktinkonzentrationen (300 ng/ml) erhöht, bei niedrigen zeigt sich eine Tendenz zu reduzierter Sekretion. Die vermehrte IL-10 Ausschüttung bei hohen Prolaktinkonzentrationen könnte eine Art limitierende, negative Rückkopplung darstellen, die den gleichzeitig hochregulierten inflammatorischen Zytokinen TNF- α und IL-12 entgegenwirkt (Brand et al., 2004).

Bisher sind eine Vielzahl von Eigenschaften des Prolaktins beschrieben worden. Ob es eine pathophysiologische Relevanz bei krankhaften autoimmunen Prozessen wie der MS hat, bedarf jedoch der weiteren Untersuchung. Ohne den Beweis einer maßgeblichen Beteiligung von Prolaktin in der Pathogenese der MS zeigen zu können ist es jedoch möglich und aussichtsreich, zu versuchen, die proinflammatorische Wirkung dieses Hormons medikamentös zu antagonisieren.

4.2 EAE und Dopaminagonisten

Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirkungen von Dopaminagonisten in der EAE, als ein anerkanntes Tiermodell der MS, zu untersuchen. In den 1990er Jahren veröffentlichten zwei Autoren bereits Arbeiten zu Therapieexperimenten mit Bromocriptin in der EAE (Dijkstra et al., 1994; Riskind et al., 1991).

In beiden Fällen wurde die EAE in der Lewis-Ratte mit aktiver Immunisierung gegen Rückenmarkshomogenisat vom Meerschweinchen induziert. Riskind et al. berichteten über eine Besserung der EAE Symptomatik mit geringerer Inzidenz und verminderten Maximalscores unter der Therapie mit 2,3 mg/kg Bromocriptin täglich. Bromocriptin wurde über ein subkutan Depot kontinuierlich abgegeben und die Therapie begann drei Tage vor Immunisierung. Mit der nachlassenden Bromocriptin-Freisetzung zeigten einige Ratten an Tag 20 einen EAE-Schub. Aus dieser Beobachtung lässt sich schließen, dass Bromocriptin wahrscheinlich auf die Effektorphase der TZ, nicht aber die Induktionsphase der Erkrankung Einfluss nimmt. Eine signifikante Reduktion des mittleren Prolaktinspiegels (von 23,3 auf 13,5 ng/ml) wurde als wichtigster Mechanismus angesehen, um die Veränderungen in der EAE zu erklären. Dijkstra et al. griffen dieses Modell auf und erweiterten es um Untersuchungen bei der rezidivierenden EAE der Lewis-Ratte. Bromocriptin (5mg/kg/d, intraperitoneal) wurde mit Beginn des ersten, und in einer anderen Gruppe, zu Beginn des zweiten EAE-Schubs verabreicht. Mit beiden Therapieformen zeigte sich im chronischen Modell eine Verkürzung des zweiten Schubs. Im akuten Modell zeigte sich eine Reduktion der Dauer der EAE-Schübe, sowie der Maximalscores in der Therapiegruppe, unabhängig davon, ob Bromocriptin von Anfang an oder erst bei klinischen Zeichen der EAE verabreicht wurde. Diese Ergebnisse lassen sich mit denen von Dijkstra et al., welche auch Wirkungen von Bromocriptin auf die Effektorphase der Immunantwort vermuteten, vereinbaren. Einen direkten Effekt von Bromocriptin auf Lymphozyten sahen Dijkstra et al. als unwahrscheinlich an, da derzeit keine D₂-Rezeptoren auf Lymphozyten nachweisbar waren (Ovadia & Abramsky, 1987); beweisen konnten sie ihre Vermutung jedoch nicht.

Beide Autoren hielten die Reduktion des in der EAE primär erhöhten Prolaktinspiegels für die wahrscheinlichste Ursache der protektiven Effekte von Dopaminagonisten.

Wir wählten als Tiermodell die EAE der SJL-Maus. Mit ihrem chronisch-schubförmigen Verlauf ist sie ein gutes Modell, um immunologische Aspekte der MS zu untersuchen. Verglichen mit der EAE der Lewis-Ratte zeigt die EAE der SJL-Maus im Hinblick auf den klinischen Verlauf und die histologischen Befunde größere Ähnlichkeiten zur MS des Menschen, als dies bei anderen EAE-Modellen der Fall ist. Desweiteren verwendeten wir neben Bromocriptin auch die zwei neueren Dopaminagonisten Pergolid und Pramipexol. Um einen Vergleich zwischen den verschiedenen Substanzen möglich zu machen, war es zuerst nötig, geeignete Dosierungen zu finden. Im Verlauf unserer Versuche variierten wir daher die Dosis der Medikamente.

Um eine verträgliche Dosis für Bromocriptin zu finden, orientierten wir uns an den Angaben von Dijkstra et al. und Riskind et al. (Dijkstra et al., 1994; Riskind et al., 1991), welche in der EAE der Lewis-Ratte 5 mg/kg i.p. und 2,3 mg/kg s.c. verwendeten. Wir begannen mit 5 mg/kg i.p. täglicher Dosis Bromocriptin und steigerten diese in den folgenden Experimenten bis auf 20 mg/kg/Tag i.p.

Für die Dosierung von Pergolid lagen uns keine Daten zur Verwendung in der EAE der SJL-Maus vor. Die Dosierungen wurden aus anderen Modellen (RA-Modelle) übernommen und von zunächst 5 mg/kg auf 20 mg/kg i.p. gesteigert.

Pramipexol wurde nach Abschätzung der relativen Potenz (Äquivalenzdosis: BCT, PGL, PPX; 10 : 2 : 1 (Drexler, 1999) zuerst mit 2 mg/kg verwendet und im Folgenden auf 4 mg/kg gesteigert.

Pramipexol 2 mg/kg dosierten wir in etwa äquivalent zu Bromocriptin 20 mg/kg. Die Äquivalenzdosis für Pergolid 5 mg/kg ist ca. 20 mg/kg Bromocriptin. In einigen Experimenten ist Pergolid mit 20 mg/kg bezüglich der Äquivalenzdosis etwa viermal höher dosiert als Bromocriptin mit 20 mg/kg.

Eine deutliche Reduktion der EAE-Scores wurde mit Bromocriptin 20 mg/kg erreicht, nicht jedoch mit äquivalenten Dosen von Pramipexol (2 mg/kg) und Pergolid (5 mg/kg). Pergolid zeigte erst mit höherer Dosis (20 mg/kg) seine therapeutische Wirkung in der EAE.

Die Ergebnisse unserer Versuche haben erstmalig gezeigt, dass Dopaminagonisten in der EAE der SJL-Maus den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen können. Unter hohen Dosierungen von Bromocriptin und Pergolid kam es zu einer signifikanten Reduktion

der EAE-Scores. Die immunsuppressiven Effekte sind Dosis-korreliert und wirken vorwiegend auf die Effektorphase.

Unsere Ergebnisse der *in vitro* Versuche zeigten nur geringe Effekte der Dopaminagonisten auf polyklonale TZ und TZ-Klone, und dies nur bei hohen Dosen (10 μ M). Eine direkte Beeinflussung der gemessenen Faktoren *in vivo* scheint daher unwahrscheinlich.

Vergleicht man die Dopaminagonisten hinsichtlich ihres Rezeptorprofil, so fällt auf, dass Bromocriptin mit hoher Affinität zu D_2 -Rezeptoren, und Pergolid mit überwiegender Affinität zu $D_2 > D_3$ - und D_1 -Rezeptoren, zu einer Reduktion der EAE führten, Pramipexol mit besonderer Affinität zu $D_3 > D_2$ -Rezeptoren hingegen nicht.

Mittels rt-PCR konnte RNA von D_1 -Rezeptoren, nicht jedoch von D_{2-4} -Rezeptoren konstitutiv in den verwendeten TZ-Klonen nachgewiesen werden. Die Expression scheint jedoch niedrig zu sein, da D_1 -Rezeptoren nur in niedriger Menge auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie nachzuweisen waren (Stefan Nessler, persönliche Kommunikation). Die Tatsache der niedrigen Expression von D_1 -Rezeptoren auf SJL-Mauszellen (nachweisbar in 1 von 8 TZ-Klonen) und des fehlenden Nachweises von D_{2-4} -Rezeptoren, und dass *in vivo* neben Pergolid (relevante D_1 -Rezeptor-Affinität) Bromocriptin (D_2), bei einer zu Pergolid vergleichbar niedrigen Äquivalenzdosis, einen supprimierenden Effekt in der EAE zeigt, machen eine führende Rolle der Dopaminrezeptoren auf Lymphozyten in unserem Versuchsaufbau unwahrscheinlich.

Weiterhin ist bemerkenswert, dass die beiden ergolinen Medikamente Bromocriptin und Pergolid zu einem deutlichen Effekt in der EAE der SJL-Maus führen, das nicht-ergoline Pramipexol hingegen nicht. Nicht eindeutig geklärt bleibt, ob Pramipexol aufgrund seiner besonderen Herkunft als einziges synthetisches Präparat in unseren Versuchen in der EAE keine Wirkung gezeigt hat, oder ob hierfür andere Gründe zu suchen sind. Einschränkend zur Vergleichbarkeit muss allerdings gesagt werden, dass die Äquivalenzdosen aus klinischen Daten zur Therapie des IPS beim Menschen stammen (Drexler, 1999). Diese Daten sind nur bedingt in das Mausmodell übertragbar.

Veränderungen des Prolaktinspiegels, mittels Dopaminagonisten, könnten über Prolaktinrezeptoren auf immunkompetenten Zellen ihre Wirkung entfalten. Prolaktinrezeptoren kommen beim Menschen (Matera et al., 1992; Russell et al., 1985),

der Ratte (Nagy et al., 1983a; Nagy et al., 1983b; Russell et al., 1984) und in der Maus (Gagnerault et al., 1993) in lymphatischem Gewebe und speziell auf T- und B-Zellen vor.

Die Bestimmung der Serum-Prolaktinwerte in unseren Experimenten zeigte, bei einer deutlichen Streuung der Werte, signifikant erniedrigte Prolaktinkonzentrationen in der Pergolid-Gruppe, welche eine klinisch signifikante Besserung unter Therapie gezeigt hatte. Die medikamentöse Senkung des Prolaktins wurde in unseren Versuchen von einem positiven klinischen Therapieeffekt begleitet.

In der Therapiegruppe mit 20 mg/kg Bromocriptin und in allen Pramipexol behandelten Gruppen konnten wir, trotz teilweise bestehenden Therapieeffekts, keine signifikante Reduktion der Prolaktinsekretion verzeichnen. Gründe hierfür könnten in den pharmakokinetischen Differenzen der Medikamente begründet sein. Pergolid hat eine Halbwertszeit von ca. 7-27 Std. (Jost W, 2000; Pezzoli et al., 1995), Pramipexol von ca. 2-12 Std. (Rascol, 1999) und Bromocriptin von nur ca. 3-6 Std. (Drewe et al., 1988). Zum Zeitpunkt der Blutentnahme waren über 12 Stunden seit der letzten Medikamentengabe vergangen. Durch die unterschiedlichen Halbwertszeiten wäre erklärbar, dass die Wirkung auf die Prolaktinsekretion nur in der Gruppe mit Pergolid messbar war. Trotzdem könnte Bromocriptin durch kürzer andauernde Prolaktinsenkungen zu einem positiven Therapieeffekt in der EAE geführt haben.

In der EAE der SJL-Maus scheint die Wirkung der drei Dopaminagonisten Bromocriptin, Pergolid und Pramipexol über Supprimierung des Prolaktinspiegels zustande zu kommen. Mehrere Beobachtungen stützen diese These: 1) In unseren in vitro Versuchen konnten wir, bei sehr hohen Dosierungen der Dopaminagonisten, nur geringe Effekte auf die Zytokinsekretion messen. 2) In durchflusszytometrischen Untersuchungen konnten wir keine D_{2.4}-, und in nur geringer Menge D₁- Rezeptoren auf Mauszellen nachweisen. 3) In unseren EAE-Experimenten beobachteten wir einen deutlichen Therapieeffekt, des überwiegend über D₂-Dopaminrezeptoren wirkenden Bromocriptins, ohne D₂-Rezeptoren auf den verwendeten Zellen nachweisen zu können. Ein direkter Effekt der getesteten Dopaminagonisten auf TZ bei der SJL-Maus erscheint unwahrscheinlich. Dieses Ergebnis lässt sich mit den Beobachtungen in anderen EAE-Modellen vereinbaren (Dijkstra et al., 1994; Riskind et al., 1991).

4.3 Dopaminagonisten und MS

In Untersuchungen zur MS wurden Dopaminagonisten bisher in zwei kleinen Studien eingesetzt. In einer Fall-Kontroll-Studie wurde von einer Unterdrückung diverser paroxysmaler Krankheitssymptomen berichtet (Khan & Olek, 1995). In einer offenen Pilotstudie mit nur 18 Patienten konnte hingegen kein therapeutischer Effekt von Bromocriptin bei MS-Patienten gezeigt werden (Bissay et al., 1994).

Eine endgültige Bewertung lassen diese Studien aufgrund ihres Aufbaus und der niedrigen Fallzahlen nicht zu. Weitere Studien sind nötig, um einen therapeutischen Nutzen der Dopaminagonisten in der MS-Therapie beurteilen zu können. Neben den wenigen und qualitativ ungenügenden klinischen Beobachtungen zu Therapieversuchen mit Dopaminagonisten bei der MS sind es vor allem Beobachtungen bei anderen Erkrankungen wie der RA oder SLE, sowie experimentelle Daten, wie z.B. bei der EAE oder den Transplantationsmodellen und in vitro Untersuchungen, die vielseitige immunsuppressive Eigenschaften der Dopaminagonisten aufzeigen, und auf eine mögliche therapeutische Anwendung dopaminerger Substanzen bei der MS hoffen lassen.

Ungeklärt bleibt, welche Auswirkung eine längere Therapie mit Dopaminagonisten auf das Immunsystem hat. Dies zu untersuchen scheint besonders wichtig, da das Immunsystem im Alter sich im Sinne einer Schwächung verändert (Linton & Dorshkind, 2004), Dopaminagonisten aber gerade bei diesen Menschen, beispielsweise in der Parkinsontherapie, vielfach eingesetzt werden.

Die Fähigkeit sich mit Infektionen und Tumoren auseinanderzusetzen ist eng an die Funktion des adaptiven und angeborenen Immunsystems geknüpft. Viele Funktionen, darunter die von T- und B-Zellen, Neutrophilen und Makrophagen sowie dendritischen Zellen, nehmen im Alter ab (Linton & Dorshkind, 2004). Viele inflammatorische Zytokine, darunter IFN- γ und IL-2 werden weniger gebildet. Interessanterweise steigt die Produktion von IL-1 β und TNF mit zunehmendem Alter an. Diese Zytokine sind fähig die Sekretion einiger Hormone, darunter einige Androgene, zu reduzieren. Wie in einem circulus vitiosus könnte dies zu einer Veränderung des Immunsystems mit einer Verschiebung der Immunantwort Richtung TH₂ und einer geschwächten zellulären Funktion mit weiterem Anstieg von IL-1 β und TNF kommen (Straub et al., 2000). Insgesamt kommt es zu einer reduzierten Sekretion einer Vielzahl von Hormonen,

darunter GH, Testosteron, Prolaktin, Östrogen, Insulinähnlicher Wachstumsfaktor I (engl.: Insulin like growth factor-1) und Calcitonin sowie vieler anderer. Deren Regulierungsmechanismen im Zusammenspiel mit dem Immunsystem sind bisher nur ungenügend charakterisiert. Es deutet jedoch vieles auf eine enge Verknüpfung und ein gemeinsames und gegenseitig sich verstärkendes Altern der beiden Systeme hin, im englischen Sprachraum auch ‚endocrinosenescence‘ und ‚immunosenescence‘ genannt. Durch Verabreichung von Dopaminagonisten wie Bromocriptin, Pergolid und Pramipexol, kommt es zu einer Erniedrigung des Serumprolaktinspiegels, was eine Immunmodulation im Sinne einer reduzierten Reaktivität fördern könnte. Die in unseren Versuchen mit der SJL-Maus therapeutisch nutzbare Immunmodulation durch Dopaminagonisten, könnte bei langfristiger Gabe besonders durch die Reduktion des Prolaktinspiegels negative Effekte auf ein alterndes Immunsystem ausüben. Auch wenn es bisher keinen Hinweis auf eine deutliche Immunsuppression durch Dopaminagonisten beim alternden Menschen gibt, sollte diese Möglichkeit bedacht und im Weiteren bei der Behandlung alter und multimorbider Patienten prospektiv untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Dopaminagonisten (DA) werden als Therapie beim idiopathischen Parkinson Syndrom und auch bei anderen chronischen ZNS-Erkrankungen zunehmend eingesetzt. Wenig Aufmerksamkeit wurde bisher auf die klinische Auswirkung des bekannten, immunsuppressiven Potentials der DA verwandt. In vitro Experimente, Untersuchungen an Tiermodellen und auch kleinere klinische Pilot-Untersuchungen bei immunvermittelten Erkrankungen, z.B. der rheumatoiden Arthritis, deuten auf eine therapeutisch nutzbare immunmodulierende Wirkung der DA hin. In dieser Arbeit untersuchten wir die Wirkung der Ergotaminderivate Bromocriptin (BCT) und Pergolid (PGL) und des synthetischen DA Pramipexol (PPX) in der Lymphozyten-Zellkultur in vitro und in der experimentell autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) der SJL-Maus, einem Tiermodell für die Multiple Sklerose.

Wir konnten zeigen dass die DA BCT und PGL dosisabhängige, immunsupprimierende Eigenschaften besitzen. Die klinischen Symptome der EAE konnte mit 20 mg/kg/d BCT reduziert werden. Äquivalente Dosen von PGL (5mg/kg) und PPX (4mg/kg) zeigten hingegen keinen Effekt auf die EAE. Pergolid führte erst in einer Dosierung von 20 mg/kg zu einer Beeinflussung der EAE. Der Behandlungseffekt wurde von einer Reduktion des Serum-Prolaktins begleitet. In vitro zeigten die drei DA auch bei hohen Konzentrationen (10 μ M) nur geringe Effekte auf Proliferation und Zytokinsekretion. Da keine D_{2-4} - und nur wenig D_1 -Rezeptoren auf unseren Zellen nachweisbar sind, sind die Effekte von BCT (D_2) und PGL ($D_2 \rightarrow D_3$ - und D_1 -Rezeptoren) in vivo nicht maßgeblich über eine Interaktion mit Dopaminrezeptoren auf Lymphozyten erklärbar. Es liegt daher nahe anzunehmen, dass die Prolaktin-Suppression in diesen Versuchen ein wichtiger Mechanismus ist.

Weitere Untersuchungen der Dopaminagonisten bei immunvermittelten Erkrankungen, v.a. der MS wären sinnvoll und wünschenswert. Darüber hinaus sollte ein verstärktes Augenmerk auf die immunsuppressiven Eigenschaften dieser Substanzen bei alten, multimorbiden Patienten gerichtet werden und prospektiv untersucht werden.

Literaturverzeichnis

Akrivis C, Vezyraki P, Kiortsis DN, Fotopoulos A, Evangelou A. Inhibition of puerperal lactation with 2-mercaptopropionyl-glycine. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 2000; 56: pp. 621-623.

Al-Shammri S, Rawoot P, Azizieh F, AbuQoor A, Hanna M, Saminathan TR, Raghupathy R. Th₁/Th₂ cytokine patterns and clinical profiles during and after pregnancy in woman with multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2004; 222: pp. 21-27.

Alvarez-Nemegyei J, Cobarrubias-Cobos A, Escalante-Triay F, Sosa-Munoz J, Miranda JM, Jara LJ. Bromocriptine in systemic lupus erythematosus: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Lupus* 1998; 7: pp. 414-419.

Andersen O, Lygner PE, Bergstrom T, Andersson M, Vahlne A. Viral infections trigger multiple sclerosis relapses: a prospective seroepidemiological study. *J.Neurol.* 1993; 240: pp. 417-422.

Archelos JJ, Storch MK, Hartung HP. The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Ann.Neurol.* 2000; 47: pp. 694-706.

Azar ST, Yamout B. Prolactin secretion is increased in patients with multiple sclerosis. *Endocr.Res.* 1999; 25: pp. 207-214.

Babbe H et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J.Exp.Med.* 2000; 192: pp. 393-404.

Barkhof F, Hommes OR, Scheltens P, Valk J. Quantitative MRI changes in gadolinium-DTPA enhancement after high-dose intravenous methylprednisolone in multiple sclerosis. *Neurology* 1991; 41: pp. 1219-1222.

Barrett JH, Brennan P, Fiddler M, Silman A. Breast-feeding and postpartum relapse in women with rheumatoid and inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: pp. 1010-1015.

Ben Nun A, Cohen IR. Vaccination against autoimmune encephalomyelitis (EAE): attenuated autoimmune T lymphocytes confer resistance to induction of active EAE but not to EAE mediated by the intact T lymphocyte line. *Eur.J.Immunol.* 1981; 11: pp. 949-952.

Bendele AM, Spaethe SM, Benslay DN, Bryant HU. Anti-inflammatory activity of pergolide, a dopamine receptor agonist. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1991; 259: pp. 169-175.

Benkert O, Muller-Siecheneder F, Wetzel H. Dopamine agonists in schizophrenia: a review. *Eur.Neuropsychopharmacol.* 1995; 5 Suppl:43-53.: pp. 43-53.

Bergquist J, Tarkowski A, Ekman R, Ewing A. Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994; 91: pp. 12912-12916.

Bissay V et al. Bromocriptine therapy in multiple sclerosis: an open label pilot study. *Clin.Neuropharmacol.* 1994; 17: pp. 473-476.

Bjartmar C, Trapp BD. Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: mechanisms and functional consequences. *Curr.Opin.Neurol.* 2001; 14: pp. 271-278.

Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr.Rev.* 1998; 19: pp. 225-268.

Bouchard B, Ormandy CJ, Di Santo JP, Kelly PA. Immune system development and function in prolactin receptor-deficient mice. *J.Immunol.* 1999; 163: pp. 576-582.

Brand J, Frohn C, Cziupka K, Brockmann C, Kirchner H, Luhm J. Prolactin triggers pro-inflammatory immune responses in peripheral immune cells. *Eur. Cytokine Netw.* 2004; 15: pp. 99-104.

Bravo G, Zazueta B, Lavalle C. An acute remission of Reiter's syndrome in male patients treated with bromocriptine. *J.Rheumatol.* 1992; 19: pp. 747-750.

Buljevac D et al. Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. *Brain* 2002; 125: pp. 952-960.

Burns J, Rosenzweig A, Zweiman B, Lisak RP. Isolation of myelin basic protein-reactive T-cell lines from normal human blood. *Cell Immunol.* 1983; 81: pp. 435-440.

Caronti B, Calderaro C, Passarelli F, Palladini G, Pontieri FE. Dopamine receptor mRNAs in the rat lymphocytes. *Life Sci.* 1998; 62: pp. 1919-1925.

Cepok S et al. Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain* 2001; 124: pp. 2169-2176.

Chen M, Valenzuela RM, Dhib-Jalbut S. Glatiramer acetate-reactive T cells produce brain-derived neurotrophic factor. *J.Neurol.Sci.* 2003; 215: pp. 37-44.

Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK. Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 1993; 33:281-307.: pp. 281-307.

Clevenger CV, Russell DH, Appasamy PM, Prystowsky MB. Regulation of interleukin 2-driven T-lymphocyte proliferation by prolactin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1990; 87: pp. 6460-6464.

Clodi M et al. The long-acting dopamine agonist bromocriptine mesylate as additive immunosuppressive drug after kidney transplantation. *Nephrol.Dial.Transplant.* 1997; 12: pp. 748-752.

Colombo M et al. Accumulation of clonally related B lymphocytes in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J.Immunol.* 2000; 164: pp. 2782-2789.

Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, Cortinovis-Tourniaire P, Moreau T. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *Pregnancy in Multiple Sclerosis Group.* *N.Engl.J.Med.* 1998; 339: pp. 285-291.

Correale J, de los Milagros Bassani Molinas. Oligoclonal bands and antibody responses in multiple sclerosis. *J.Neurol.* 2002; 249: pp. 375-389.

Cross AH, Trotter JL, Lyons J. B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. *J.Neuroimmunol.* 2001; 112: pp. 1-14.

Dijkstra CD et al. Therapeutic effect of the D2-dopamine agonist bromocriptine on acute and relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *Psychoneuroendocrinology* 1994; 19: pp. 135-142.

Drewe J, Mazer N, Abisch E, Krummen K, Keck M. Differential effect of food on kinetics of bromocriptine in a modified release capsule and a conventional formulation. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 1988; 35: pp. 535-541.

Drexler S, Parkinson Report vom 13. Internationalen Parkinson-Kongress in Vancouver, British Columbia, Kanada 1999, Beilage in Neurotransmitter Nr. 5/99

Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2004; 3: pp. 104-110.

Ebers GC, Sadovnick AD. The role of genetic factors in multiple sclerosis susceptibility. *J.Neuroimmunol.* 1994; 54: pp. 1-17.

Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. *Canadian Collaborative Study Group.* *Nature* 1995; 377: pp. 150-151.

Figuerola F, Carrion F, Martinez ME, Rivero S, Mamani I, Gonzalez G. [Effects of bromocriptine in patients with active rheumatoid arthritis]. *Rev.Med.Chil.* 1998; 126: pp. 33-41.

Figuerola FE, Carrion F, Martinez ME, Rivero S, Mamani I. Bromocriptine induces immunological changes related to disease parameters in rheumatoid arthritis. *Br.J.Rheumatol.* 1997; 36: pp. 1022-1023.

Filippi M et al. Evidence for widespread axonal damage at the earliest clinical stage of multiple sclerosis. *Brain* 2003; 126: pp. 433-437.

Francis PC, Carlson KH, Owen NV, Adams ER. Preclinical toxicology studies with the new dopamine agonist pergolide. Acute, subchronic, and chronic evaluations. *Arzneimittelforschung*. 1994; 44: pp. 278-284.

Gagnerault MC, Touraine P, Savino W, Kelly PA, Dardenne M. Expression of prolactin receptors in murine lymphoid cells in normal and autoimmune situations. *J.Immunol*. 1993; 150: pp. 5673-5681.

Gao YL, Rajan AJ, Raine CS, Brosnan CF. gammadelta T cells express activation markers in the central nervous system of mice with chronic-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Autoimmun*. 2001; 17: pp. 261-271.

Giovannoni G. Management of secondary-progressive multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 2004; 18: pp. 653-669

Goffin V et al. Prolactin: a hormone at the crossroads of neuroimmunoendocrinology. *Ann.N.Y.Acad.Sci*. 1998; 840:498-509.: pp. 498-509.

Goldstein M, Lieberman A, Lew JY, Asano T, Rosenfeld MR, Makman MH. Interaction of pergolide with central dopaminergic receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1980; 77: pp. 3725-3728.

Gonsette RE. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: when and how to treat? *J.Neurol.Sci*. 2003; 206: pp. 203-208.

Grauer O, Offenhausser M, Schmidt J, Toyka KV, Gold R. [Glucocorticosteroid therapy in optic neuritis and multiple sclerosis. Evidence from clinical studies and practical recommendations]. *Nervenarzt* 2001; 72: pp. 577-589.

Hartmann DP, Holaday JW, Bernton EW. Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin. *FASEB J*. 1989; 3: pp. 2194-2202.

Hartung HP et al. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet* 2002; 360: pp. 2018-2025.

Heesen C, Gold SM, Bruhn M, Monch A, Schulz KH. Prolactin stimulation in multiple sclerosis--an indicator of disease subtypes and activity? *Endocr.Res*. 2002a; 28: pp. 9-18.

Heesen C, Schulz H, Schmidt M, Gold S, Tessmer W, Schulz KH. Endocrine and cytokine responses to acute psychological stress in multiple sclerosis. *Brain Behav.Immun*. 2002b; 16: pp. 282-287.

Hemmer B, Cepok S, Nessler S, Sommer N. [New approaches in research of therapy of multiple sclerosis]. *Med.Klin*. 2001; 96 Suppl 1:23-8.: pp. 23-28.

Hemmer B, Cepok S, Nessler S, Sommer N. Pathogenesis of multiple sclerosis: an update on immunology. *Curr.Opin.Neurol.* 2002; 15: pp. 227-231.

Hemmer B et al. Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. *J.Exp.Med.* 1997; 185: pp. 1651-1659.

Hemmer B, Kieseier B, Cepok S, Hartung HP. New immunopathologic insights into multiple sclerosis. *Curr.Neurol.Neurosci.Rep.* 2003; 3: pp. 246-255.

Herzog AG. Continuous bromocriptine therapy in menstrual migraine. *Neurology* 1997; 48: pp. 101-102.

Hoftberger R et al. Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol.* 2004; 14: pp. 43-50.

Hohlfeld R. Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives. *Brain* 1997; 120: pp. 865-916.

Hohlfeld R, Wekerle H. Immunological update on multiple sclerosis. *Curr.Opin.Neurol.* 2001; 14: pp. 299-304.

Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlen C, Goverman J. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J.Exp.Med.* 2001; 194: pp. 669-676.

Iglesias A, Bauer J, Litzemberger T, Schubart A, Linington C. T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Glia* 2001; 36: pp. 220-234.

Izumi T et al. Open pergolide treatment of tricyclic and heterocyclic antidepressant-resistant depression. *J.Affect.Disord.* 2000; 61: pp. 127-132.

Jacobs LD et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann.Neurol.* 1996; 39: pp. 285-294.

Johnson KP et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1995; 45: pp. 1268-1276.

Jost W: Therapie des idiopathischen Parkinson Syndroms, Uni-Med Verlag, Bremen, 2000

Katz D, Taubenberger JK, Cannella B, McFarlin DE, Raine CS, McFarland HF. Correlation between magnetic resonance imaging findings and lesion development in chronic, active multiple sclerosis. *Ann.Neurol.* 1993; 34: pp. 661-669.

Kennedy MK et al. Inhibition of murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by immune tolerance to proteolipid protein and its encephalitogenic peptides. *J.Immunol.* 1990; 144: pp. 909-915.

Khan OA, Olek MJ. Treatment of paroxysmal symptoms in multiple sclerosis with bromocriptine. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 1995; 58: pp. 253.

Kieseier BC, Hartung HP. Current disease-modifying therapies in multiple sclerosis. *Semin.Neurol.* 2003; 23: pp. 133-146.

Kinnunen E et al. Genetic susceptibility to multiple sclerosis. A co-twin study of a nationwide series. *Arch.Neurol.* 1988; 45: pp. 1108-1111.

Kira J, Harada M, Yamaguchi Y, Shida N, Goto I. Hyperprolactinemia in multiple sclerosis. *J.Neurol.Sci.* 1991; 102: pp. 61-66.

Kuchroo VK, Anderson AC, Waldner H, Munder M, Bettelli E, Nicholson LB. T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire. *Annu.Rev.Immunol.* 2002; 20:101-23.: pp. 101-123.

Kurtzke JF. Epidemiology of multiple sclerosis. Does this really point toward an etiology? *Lectio Doctoralis. Neurol.Sci.* 2000a; 21: pp. 383-403.

Kurtzke JF. Multiple sclerosis in time and space--geographic clues to cause. *J.Neurovirol.* 2000b; 6 Suppl 2:S134-40.: pp. S134-S140.

Kurtzke JF, Hyllested K, Heltberg A. Multiple sclerosis in the Faroe Islands: transmission across four epidemics. *Acta Neurol.Scand.* 1995; 91: pp. 321-325.

Lassmann H, Suchanek G, Ozawa K. Histopathology and the blood-cerebrospinal fluid barrier in multiple sclerosis. *Ann.Neurol.* 1994; 36 Suppl:S42-6.: pp. S42-S46.

Lehmann PV, Sercarz EE, Forsthuber T, Dayan CM, Gammon G. Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T-cell repertoire. *Immunol.Today* 1993; 14: pp. 203-208.

Levite M, Chowers Y, Ganor Y, Besser M, HersHKovits R, Cahalon L. Dopamine interacts directly with its D3 and D2 receptors on normal human T cells, and activates beta1 integrin function. *Eur.J.Immunol.* 2001; 31: pp. 3504-3512.

Li J, Johansen C, Bronnum-Hansen H, Stenager E, Koch-Henriksen N, Olsen J. The risk of multiple sclerosis in bereaved parents: A nationwide cohort study in Denmark. *Neurology* 2004; 62: pp. 726-729.

Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat.Immunol.* 2004; 5: pp. 133-139.

Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann.Neurol.* 2000; 47: pp. 707-717.

Mader R. [Bromocriptine for refractory rheumatoid arthritis]. *Harefuah* 1997; 133: pp. 527-9, 591.

Markovic-Plese S, McFarland HF. Immunopathogenesis of the multiple sclerosis lesion. *Curr.Neurol.Neurosci.Rep.* 2001; 1: pp. 257-262.

Martin R et al. Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals. *J.Immunol.* 1990; 145: pp. 540-548.

Martin R, McFarland HF, McFarlin DE. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu.Rev.Immunol.* 1992b; 10:153-87.: pp. 153-187.

Martin R, McFarland HF, McFarlin DE. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu.Rev.Immunol.* 1992a; 10:153-87.: pp. 153-187.

Martin R et al., *Neurological Disorders: Course and treatment*, Academic Press, San Diego 1996

Martinelli GP, Liu H, Clarke WP, Heisenleder DJ, Knight RJ. Prolactin suppression enhances the effects of perioperative donor-specific blood transfusions on graft survival. *J.Surg.Res.* 1996; 64: pp. 190-197.

Matera L. Endocrine, paracrine and autocrine actions of prolactin on immune cells. *Life Sci.* 1996; 59: pp. 599-614.

Matera L, Contarini M, Bellone G, Forno B & Biglino A. Up-modulation of interferon- γ mediates the enhancement of spontaneous cytotoxicity in prolactin-activated natural killer cells. *Immunol.* 1999; 98: pp. 386-392.

Matera L, Mori M, Geuna M, Buttiglieri S, Palestro G. Prolactin in autoimmunity and antitumor defence. *J. Immunol.* 2000; 109: pp. 47-55.

Matera L, Mori M, Galetto A. Effect of the antigen presenting function of monocyte-derived dendritic cells. *Lupus* 2001; 10: pp. 728-734.

Matera L, Beltramo E, Martinuzzi E & Buttiglieri S. Effect of prolactin on carcinoembryonic antigen-specific cytotoxic T lymphocyte response induced by dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2004; 137: pp. 320-328.

Matera L, Cesano A, Bellone G, Oberholtzer E. Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen-induced activity of T, B, and NK lymphocytes. *Brain Behav. Immun.* 1992; 6: pp. 409-417.

McDonald WI et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann.Neurol.* 2001; 50: pp. 121-127.

McFarland HF. The emerging role of MRI in multiple sclerosis and the new diagnostic criteria. *Mult.Scler.* 2002; 8: pp. 71-72.

McKenna F et al. Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: a flow cytometric study. *J.Neuroimmunol.* 2002; 132: pp. 34-40.

McMurray RW. Bromocriptine in rheumatic and autoimmune diseases. *Semin.Arthritis Rheum.* 2001; 31: pp. 21-32.

Medana IM, Esiri MM. Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS diseases. *Brain* 2003; 126: pp. 515-530.

Michelson D et al. Multiple sclerosis is associated with alterations in hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1994; 79: pp. 848-853.

Mierau J, Schneider FJ, Ensinger HA, Chio CL, Lajiness ME, Huff RM. Pramipexole binding and activation of cloned and expressed dopamine D2, D3 and D4 receptors. *Eur.J.Pharmacol.* 1995; 290: pp. 29-36.

Mohr DC, Hart SL, Julian L, Cox D, Pelletier D. Association between stressful life events and exacerbation in multiple sclerosis: a meta-analysis. *BMJ* 2004; 329: pp. 969-974.

Morgen K et al. Ring-enhancement in multiple sclerosis: marker of disease severity. *Mult.Scler.* 2001; 7: pp. 167-171.

Morikawa K, Oseko F, Morikawa S. Immunosuppressive activity of bromocriptine on human T lymphocyte function in vitro. *Clin.Exp.Immunol.* 1994; 95: pp. 514-518.

Morikawa K, Oseko F, Morikawa S. Immunosuppressive property of bromocriptine on human B lymphocyte function in vitro. *Clin.Exp.Immunol.* 1993; 93: pp. 200-205.

Mumford CJ, Wood NW, Kellar-Wood H, Thorpe JW, Miller DH, Compston DA. The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology* 1994; 44: pp. 11-15.

Murphy WJ, Durum SK, Longo DL. Role of neuroendocrine hormones in murine T cell development. Growth hormone exerts thymopoietic effects in vivo. *J.Immunol.* 1992; 149: pp. 3851-3857.

Nagy E, Berczi I. Immunodeficiency in hypophysectomized rats. *Acta Endocrinol.(Copenh)* 1978; 89: pp. 530-537.

- Nagy E, Berczi I. Hypophysectomized rats depend on residual prolactin for survival. *Endocrinol.* 1991; 128: pp 2776-84
- Nagy E, Berczi I, Friesen HG. Regulation of immunity in rats by lactogenic and growth hormones. *Acta Endocrinol.(Copenh)* 1983a; 102: pp. 351-357.
- Nagy E, Berczi I, Wren GE, Asa SL, Kovacs K. Immunomodulation by bromocriptine. *Immunopharmacology* 1983b; 6: pp. 231-243.
- Neidhart M. Bromocriptine has little direct effect on murine lymphocytes, the immunomodulatory effect being mediated by the suppression of prolactin secretion. *Biomed.Pharmacother.* 1997; 51: pp. 118-125.
- Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci.* 2002; 25: pp. 313-319.
- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N.Engl.J.Med.* 2000; 343: pp. 938-952.
- Olanow CW et al. A multicenter double-blind placebo-controlled trial of pergolide as an adjunct to Sinemet in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 1994; 9: pp. 40-47.
- Olerup O, Hillert J. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 1991; 38: pp. 1-15.
- Olsson T. Cytokines in neuroinflammatory disease: role of myelin autoreactive T cell production of interferon-gamma. *J.Neuroimmunol.* 1992; 40: pp. 211-218.
- Olsson T et al. Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of interferon-gamma. *J.Clin.Invest* 1990; 86: pp. 981-985.
- Ormandy CJ et al. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev.* 1997; 11: pp. 167-178.
- Orrego JJ, Chandler WF, Barkan AL. Pergolide as primary therapy for macroprolactinomas. *Pituitary.* 2000; 3: pp. 251-256.
- Ovadia H, Abramsky O. Dopamine receptors on isolated membranes of rat lymphocytes. *J.Neurosci.Res.* 1987; 18: pp. 70-74.
- Palaszynski KM, Liu H, Loo KK, Voskuhl RR. Estriol ameliorates disease in males with experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2004; 149: pp. 84-89.
- Panajotova V. The effect of dopaminergic agents on cell-mediated immune response in mice. *Physiol Res.* 1997; 46: pp. 113-118.

Parlow AF. National hormone and peptide program (NHPP): New recombinant hormones, hypothalamic peptides, natural hormones, new antisera, & expanded hormone assay services available. *Mol. Endocrinol.* 2004; 18: pp.1046-8.

Pelfrey CM, Trotter JL, Tranquill LR, McFarland HF. Identification of a novel T cell epitope of human proteolipid protein (residues 40-60) recognized by proliferative and cytolytic CD4⁺ T cells from multiple sclerosis patients. *J.Neuroimmunol.* 1993; 46: pp. 33-42.

Pelfrey CM, Trotter JL, Tranquill LR, McFarland HF. Identification of a second T cell epitope of human proteolipid protein (residues 89-106) recognized by proliferative and cytolytic CD4⁺ T cells from multiple sclerosis patients. *J.Neuroimmunol.* 1994; 53: pp. 153-161.

Perachon S, Schwartz JC, Sokoloff P. Functional potencies of new antiparkinsonian drugs at recombinant human dopamine D1, D2 and D3 receptors. *Eur.J.Pharmacol.* 1999; 366: pp. 293-300.

Perugi G, Toni C, Ruffolo G, Frare F, Akiskal H. Adjunctive dopamine agonists in treatment-resistant bipolar II depression: an open case series. *Pharmacopsychiatry* 2001; 34: pp. 137-141.

Petry KG, Boullerne AI, Pousset F, Brochet B, Caille JM, Dousset V. Experimental allergic encephalomyelitis animal models for analyzing features of multiple sclerosis. *Pathol.Biol.(Paris)* 2000; 48: pp. 47-53.

Pezzoli G, Canesi M, Pesenti A, Mariani CB. Pergolide mesylate in Parkinson's disease treatment. *J.Neural Transm.Suppl* 1995; 45:203-12.: pp. 203-212.

Piercey MF, Hoffmann WE, Smith MW, Hyslop DK. Inhibition of dopamine neuron firing by pramipexole, a dopamine D3 receptor-preferring agonist: comparison to other dopamine receptor agonists. *Eur.J.Pharmacol.* 1996; 312: pp. 35-44.

Poser CM et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann.Neurol.* 1983; 13: pp. 227-231.

Racke MK, Dhib-Jalbut S, Cannella B, Albert PS, Raine CS, McFarlin DE. Prevention and treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by transforming growth factor-beta 1. *J.Immunol.* 1991; 146: pp. 3012-3017.

Raine CS. Multiple sclerosis: immune system molecule expression in the central nervous system. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 1994; 53: pp. 328-337.

Rajan AJ, Klein JD, Brosnan CF. The effect of gammadelta T cell depletion on cytokine gene expression in experimental allergic encephalomyelitis. *J.Immunol.* 1998; 160: pp. 5955-5962.

Rascol O. Dopamine agonists: what is the place of the newer compounds in the treatment of Parkinson's disease? *J.Neural Transm.Suppl* 1999; 55:33-45.: pp. 33-45.

Riskind PN, Massacesi L, Doolittle TH, Hauser SL. The role of prolactin in autoimmune demyelination: suppression of experimental allergic encephalomyelitis by bromocriptine. *Ann.Neurol.* 1991; 29: pp. 542-547.

Russell DH, Kibler R, Matrisian L, Larson DF, Poulos B, Magun BE. Prolactin receptors on human T and B lymphocytes: antagonism of prolactin binding by cyclosporine. *J.Immunol.* 1985; 134: pp. 3027-3031.

Russell DH, Larson DF, Cardon SB, Copeland JG. Cyclosporine inhibits prolactin induction of ornithine decarboxylase in rat tissues. *Mol.Cell Endocrinol.* 1984; 35: pp. 159-166.

Sadovnick AD et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann.Neurol.* 1993; 33: pp. 281-285.

Salemi G, Callari G, Gammino G, Battaglieri F, Cammarata E, Cuccia G, D'Amelio M, Lupo I, Ragonese P, Savettieri G. The relapse rate of multiple sclerosis changes during pregnancy: a cohort study. *Ann. Neurol. Scand.* 2004; 110: pp. 23-26.

Skulina C et al. Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004; 101: pp. 2428-2433.

Sommer N et al. Therapeutic potential of phosphodiesterase type 4 inhibition in chronic autoimmune demyelinating disease. *J.Neuroimmunol.* 1997; 79: pp. 54-61.

Steger RW, Chandrashekar V, Zhao W, Bartke A, Horseman ND. Neuroendocrine and reproductive function in male mice with targeted disruption of the prolactin gene. *Endocrinol.* 1998; 139: pp. 3691-3695.

Steinman L. Myelin-specific CD8 T cells in the pathogenesis of experimental allergic encephalitis and multiple sclerosis. *J.Exp.Med.* 2001; 194: pp. F27-F30.

Stiasny K, Wetter TC, Trenkwalder C, Oertel WH. Restless legs syndrome and its treatment by dopamine agonists. 2000; 7: pp. 21-25.

Straub RH, Miller LE, Schölmerich J, Zietz B. Cytokines and hormones as possible links between endocrinosenescence and immunosenescence. *J. Immunol.* 2000; 109: pp. 10-15.

Sun D et al. Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J.Immunol.* 2001; 166: pp. 7579-7587.

Swanborg RH. Experimental allergic encephalomyelitis. *Methods Enzymol.* 1988; 162:413-21.: pp. 413-421.

Then BF, Kumpfel T, Trenkwalder C, Rupprecht R, Holsboer F. Dysregulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis is related to the clinical course of MS. *Neurology* 1999; 53: pp. 772-777.

Tolosa E, Marti MJ, Valldeoriola F, Molinuevo JL. History of levodopa and dopamine agonists in Parkinson's disease treatment. *Neurology* 1998; 50: pp. S2-10.

Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N.Engl.J.Med.* 1998; 338: pp. 278-285.

Trapp BD, Ransohoff R, Rudick R. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr.Opin.Neurol.* 1999; 12: pp. 295-302.

Tuohy VK. Peptide determinants of myelin proteolipid protein (PLP) in autoimmune demyelinating disease: a review. *Neurochem.Res.* 1994; 19: pp. 935-944.

Vukusic S, Hutchinson M, Hours M, Moreau T, Cortinavis-Tournaire P, Adeleine P, Confavreux C and the Pregnancy in multiple sclerosis group. Pregnancy and multiple sclerosis (the PRIMS study): clinical predictors of post-partum relapse. *Bain* 2004; 127: pp. 1353-1360.

Weber G, Frey H. [Treatment of psoriasis arthropathica with bromocriptine]. *Z.Hautkr.* 1986; 61: pp. 1456-1466.

Webster J. A comparative review of the tolerability profiles of dopamine agonists in the treatment of hyperprolactinaemia and inhibition of lactation. *Drug Saf* 1996; 14: pp. 228-238.

Weimerskirch PR, Ernst ME. Newer dopamine agonists in the treatment of restless legs syndrome. *Ann.Pharmacother.* 2001; 35: pp. 627-630.

Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C. Animal models. *Ann.Neurol.* 1994; 36 Suppl:S47-53.: pp. S47-S53.

Whitacre CC, Reingold ST, O'Looney PA, and the Task Force on Gender, Multiple sclerosis and Autoimmunity. A gender gap in autoimmunity. *Science*, 1999; 5406: pp. 1277-1278. + Supplementary material

Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nature Immunol.* 2001; 9: pp. 777-780.

Willenborg DO. Experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat: studies on the mechanism of recovery from disease and acquired resistance to reinduction. *J.Immunol.* 1979; 123: pp. 1145-1150.

Williams KA, Deber CM. The structure and function of central nervous system myelin. Crit Rev.Clin.Lab Sci. 1993; 30: pp. 29-64.

Wilner ML, Ettenger RB, Koyle MA, Rosenthal JT. The effect of hypoprolactinemia alone and in combination with cyclosporine on allograft rejection. Transplantation 1990; 49: pp. 264-267.

Wright CE, Sisson TL, Ichhpurani AK, Peters GR. Steady-state pharmacokinetic properties of pramipexole in healthy volunteers. J.Clin.Pharmacol. 1997; 37: pp. 520-525.

Yilmaz Z, Sozuer E, Banli O. Effect of combination of cyclosporine A and bromocriptine on survival of renal allografts in dogs. Transplant.Proc. 1998; 30: pp. 839-841.

Yongjin J, ZiLin F, Zhenmei B. Bromocriptine as an adjuvant to cyclosporine immunosuppression after renal transplantation. Transplant.Proc. 1997; 29: pp. 297.

Zamvil SS, Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. Annu.Rev.Immunol. 1990; 8:579-621.: pp. 579-621.

Zipp F, Sommer N, Rosener M, Dichgans J, Martin R. [Multiple sclerosis. New therapeutic strategies in the experimental stage]. Nervenarzt 1997; 68: pp. 94-101.

Meine Akademischen Lehrer waren:

In Marburg:

A. Bittner
B. Hemmer
S. Nessler
W. Oertel
N. Sommer
M. Teeper

In London:

D. McCabe
J. Duncan
G. Giovannoni
D. H. Miller

In Würzburg:

P. Rieckmann
K. Ruprecht

Danksagung

Ich möchte allen Danksagen, die mir bei dem Entstehen meiner Dissertation geholfen haben:

Ganz besonders Herrn Professor Dr. med. Sommer für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und seine schnelle und präzise Hilfe bei meinen Experimenten sowie der Abfassung der Dissertation.

Stefan Nessler für die sehr gute Betreuung meiner gesamten Arbeit, sowohl bei den Zellkulturarbeiten als auch bei den Tierversuchen.

Frau Dr. Alwina Bittner für viele praktische Hilfen im Laboralltag. Professor Dr. med. Bernhard Hemmer danke ich für die vielen Anregungen während der Seminare. Der neuroimmunologischen Arbeitsgruppe und den Zugehörigen des Liquorlabors danke ich für die freundliche Aufnahme und die gute Zusammenarbeit.

Herrn Professor Dr. med. W. Oertel danke ich für die allgemeine Unterstützung.

Ehrenwörtliche Erklärung:

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Das immunsuppressive Potential von Dopaminrezeptoragonisten“ im Medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde, Fachbereich Neurologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. W. Oertel mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. N. Sommer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt habe und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde als Poster auf dem Treffen der European Neurological Society 2002 in Berlin vorgestellt und wird in Kürze veröffentlicht werden.

Marburg, den